

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Biochemie



Bc. Květoslava Křížková

*Příprava a charakterizace selektivních analogů insulinu a IGF-II pro různé
isoformy insulinového receptoru*

*Preparation and characterization of selective analogues of insulin and IGF-II
for various isoforms of the insulin receptor*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce/Školitel

Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

RNDr. Lenka Žáková, Ph.D.

Praha 2014

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci sepsala samostatně pod vedením své konzultantky RNDr. Lenky Žákové, PhD. a školitelky paní prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. Všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyly předloženy k získání stejného nebo jiného akademického titulu.

V Praze, dne.....

Podpis.....

ABSTRAKT

Moderní způsob života s nedostatkem pohybu a zdravé stravy často vede k obezitě doprovázené poklesem biologického účinku insulinu, vzniku hyperinsulinémie a onemocnění diabetes mellitus typu 2. Trvalé vysoké koncentrace insulinu stimulují signální dráhy s růstovými účinky a buňky se tak stávají citlivější k mitogenním účinkům všech růstových faktorů, což může vést až ke ztrátě kontroly nad buněčnou proliferací a vzniku škály zhoubných nádorů.

Díky vysoké strukturní homologii insulinu a růstových faktorů IGF-I/II stejně jako příslušných receptorů IR (vyskytujících se v organismu v „mitogenní“ isoformě IR-A a „metabolické“ isoformě IR-B) a IGF-1R dochází ke křížovým interakcím mezi hormony a jejich receptory, avšak biologická odpověď při vazbě hormonu na receptor může být různá. Určení strukturních oblastí molekul insulinu a IGF, účastnících se vazby na receptor, by mohlo vést k přípravě analogů insulinu, u nichž by byl posílen metabolický účinek a naopak antagonistů IGF, které by naopak potlačovaly mitogenní efekt.

K největšímu překryvu dochází v případě insulinu a IGF-II, protože oba hormony jsou schopné se s vysokou afinitou navázat na isoformu A insulinového receptoru (IR-A) a aktivovat ho. Avšak po vazbě insulinu převládá aktivace metabolické a po vazbě IGF-II mitogenní dráhy. Z předešlých studií vyplývá, že se interakce s IR i IGF-1R účastní doména C molekul obou IGF a zdatně moduluje jejich vazebné afinity. Předkládaná práce se zaměřuje na studium domény C faktoru IGF-II. Byly vytvořeny analogy insulinu, k jejichž C-konci řetězce B byly postupně připojeny první čtyři aminokyseliny odvozené z domény C IGF-II (SRVSRRSR), přesně S^{B31-} , $SR^{B31-32-}$, $SKV^{B31-33-}$ a $SKVS^{B31-34-}$ -insulin. Na základě vazebných schopností IGF-II se předpokládalo, že u vytvořených analogů insulinu bude posílena afinita k receptoru IR-A a IGF-1R a snížena afinita k IR-B.

U všech analogů byly zjištěny nižší afinity k IR-A oproti lidskému insulinu, přičemž míra poklesu afinity nekorelovala s prodlužováním připojeného řetězce. $SKV^{B31-33-}$ -insulin vykazoval dle předpokladu nižší afinitu k IR-B ve srovnání se svou afinitou k IR-A. Navzdory očekávání u S^{B31-} a $SKVS^{B31-34-}$ -insulinu byla naopak stanovena vyšší afinita k IR-B vzhledem k afinitám k IR-A, přičemž $SKVS^{B31-34-}$ -insulin měl dokonce vyšší afinitu než lidský insulin (148% hodnoty lidského insulinu). $SR^{B31-32-}$ -insulin měl překvapivě velmi nízkou hodnotu k oběma isoformám IR (IR-A: 0,09 %, IR-B: 0,2 % hodnot lidského insulinu). Všechny analogy (mimo $SR^{B31-32-}$ -insulinu, který nebyl testován) vykazovaly vazebnou afinitu k IGF-1R podobnou hodnotě afinity insulinu (100 %), avšak s prodlužující se délkou připojeného řetězce hodnoty afinit mírně rostly (104 – 150 % hodnoty lidského insulinu), přičemž nejvyšší afinitu měl $SKV^{B31-33-}$ -insulin (150 %).

Předmětem práce byla i příprava proteinu Gly¹-IGF-II metodou rekombinantní exprese v bakteriálním systému *E. coli*. Protein byl připraven za účelem zavedení nové metody přípravy analogů IGF-II a současného vytvoření referenční látky. Gly¹-IGF-II byl porovnán s komerčně dostupným lidským IGF-II, přičemž vlastnosti molekul byly srovnatelné ve všech testovaných oblastech.

ABSTRACT

Modern lifestyle with its lack of exercise and healthy diet often leads to obesity which is accompanied by a decreasing biological effect of insulin and the onset of hyperinsulinemia, and consequently type 2 diabetes. Persistently high levels of insulin stimulate signalling pathways with growth effects; cells thus become more sensitive to mitogenic effects of all growth factors which may even lead to the loss of control over cell proliferation and the rise of various malignancies.

Due to a high degree of structure homology of insulin, IGF-I/II as well as particular IR (existing in “mitogenic” IR-A isoform and “metabolic” IR-B isoform) and IGF-1R, there are a number of cross-interaction among hormones and receptors; nevertheless, the biological response may be different during the binding to a receptor. The determination of the crucial structural regions in insulin and IGF which are responsible for binding to the receptors could lead to the evolution of selective insulin analogues with strengthen metabolic effects, or could lead to the evolution of selective antagonism of IGF which would, in turn, suppress the mitogenic effect.

The highest overlap is between insulin and IGF-II since both hormones are able to bind to the isoform A of an insulin receptor (IR-A) with a high affinity, and to activate it. There are, however, some differences after a binding event because insulin triggers predominantly metabolic pathways and IGF-II mitogenic pathways. Previous studies showed that C domain of IGF participates in the interaction with IR and IGF-1R, and it significantly modulates their affinities. This thesis examines the C domain of IGF-II. We developed several insulin analogues to which C-terminal of B-chain we gradually extended the first four amino acids of IGF-II (SRVSRRSR), exactly S^{B31} -, SR^{B31-32} -, SKV^{B31-33} -, $SKVS^{B31-34}$ -insulin. Based on the binding abilities of IGF-II, we assumed that created insulin analogues will have the increased affinity to IR-A and IGF-1R receptors, and decreased to IR-B.

All the analogues had a lower affinity to IR-A compared to human insulin while the rate of a decrease did not correlate with the extension of the chain. SKV^{B31-33} -insulin showed, according to our assumption, a lower affinity to IR-B in comparison with its affinity to IR-A. Despite our expectations, S^{B31} - and $SKVS^{B31-34}$ -insulin, there were a higher affinity to IR-B with respect to the affinities to IR-A while $SKVS^{B31-34}$ had an even higher affinity than human insulin (150% of the value of human insulin). Surprisingly, SR^{B31-32} -insulin had a very low value of affinity to both IR isoforms (IR-A: 0,09%, IR-B: 0,2% of the values of human insulin). All the analogues (except SR^{B31-31} -insulin which was not tested) had a similar binding affinity to IGF 1R to that of insulin (100%); but with the extending B-chain, the affinity increased slightly (104 – 150 % of the value of human insulin). Consequently, the SKV^{B31-33} -insulin showed the highest affinity to IGF-1R (150 %).

The next aim of this study was to recombinantly prepare Gly^{-1} IGF-II in *E. coli*. The protein was prepared in order to introduce the new preparation method of analogues IGF-II and simultaneous creation of a reference substance. The main purpose of the preparation of the protein was to introduce a new method of the preparation of analogues of IGF-II, and to prepare a referent substance at the same time. Gly^{-1} IGF-II was then compared to a commercially available human wild type of IGF-II while the characteristics were comparable in all tested fields. (In Czech)

Úvodem bych chtěla poděkovat své konzultantce RNDr. Lence Žákové, PhD. za odborné vedení, vstřícnost, trpělivost a velkou pomoc s tvorbou diplomové práce a své školitelce paní prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za laskavost a umožnění tvorby této práce. Současně bych chtěla poděkovat panu RNDr. Jiřímu Jiráčkovi, CSc. za vstřícnost a cenné rady zejména v experimentální části práce a Dr. Václavu Vaňkovi za pomoc s experimentální částí v oblasti organické chemie. Dr. Veverkovi a celému kolektivu laboratoře Dr. Řezáčové bych ráda poděkovala za cenné rady a umožnění práce v jejich laboratoři během rekombinantní přípravy proteinů. Stejně tak bych chtěla poděkovat celému kolektivu laboratoře Dr. Jiráčka za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě chci poděkovat svému příteli a své rodině za vytvoření rodinného zázemí během studia a podporu při něm.

OBSAH

Abstrakt.....	3
Abstract.....	4
Seznam použitých zkratk.....	8
1. ÚVOD.....	10
1.1. Historie a objev insulinu.....	10
1.2. Insulin.....	11
1.3. Insulinový receptor.....	13
1.4. Aminokyseliny důležité pro funkci a strukturu insulinu.....	14
1.5. Vazba insulinu na insulinový receptor.....	15
1.6. Mechanismy signalizace.....	17
1.6.1. Metabolické účinky insulinu.....	18
1.6.2. Mitogenní účinky insulinu.....	20
1.7. Hyperinsulinémie.....	22
1.8. Růstové faktory podobné insulinu, IGF.....	24
1.9. Receptory pro IGF.....	25
1.10. Selektivní interakce mezi hormony a receptory.....	27
2. CÍLE PRÁCE.....	31
3. MATERIÁL.....	32
4. METODY.....	34
4.1. Příprava peptidů.....	34
4.1.1. Příprava peptidů manuální syntézou na pevné fázi.....	34
4.1.2. Automatická syntéza peptidů na pevné fázi.....	35
4.2. Konverze Boc-G-F-F-Y(O- <i>t</i> Bu)-T(O- <i>t</i> Bu)-P-K(Pac)-T(O- <i>t</i> Bu)-S(O- <i>t</i> Bu)-R(Pmc) na Boc-G-F-F-Y(O- <i>t</i> Bu)-T(O- <i>t</i> Bu)-P-K(Pac)-T(O- <i>t</i> Bu)-S(O- <i>t</i> Bu)-R(Pmc)-OCH ₃	36
4.2.1. Provedení esterifikace.....	36
4.2.3. Odštěpení chránících skupin (Boc, <i>t</i> Bu a Pmc).....	36
4.3. Příprava desoktapeptid ^{B23-30} insulinu (DOI).....	37
4.3.1. Odstranění iontů Zn ²⁺ z vepřového insulinu.....	37
4.3.2. Štěpení koncového oktapeptidu vepřového insulinu.....	37
4.4. Použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reversní fázi (RP-HPLC) k rozdělení peptidů.....	37
4.4.1. Použití analytické RPHPLC k analýzám roztoků látek a reakčních směsí.....	38
4.4.2. Použití preparativní RP-HPLC pro izolaci peptidů.....	39
4.5. Hmotnostní spektrometrie meziproduktů a výsledných analogů insulinu/IGF-II.....	39
4.6. Enzymová semisyntéza analogů insulinu.....	39
4.6.1. Semisyntéza K(Pac) ^{B29} S ^{B31} -insulinu.....	39
4.6.2. Semisyntéza K(Pac) ^{B29} SR ^{B31-32} -, K(Pac) ^{B29} SK(Pac)V ^{B31-33} - K(Pac) ^{B29} SK(Pac)VS ^{B31-34} -insulinu.....	40
4.6.3. Odstranění fenylacetylové chránicí skupiny postranního řetězce Lys.....	40
4.7. Rekombinantní příprava Gly ⁻¹ IGF-II.....	41
4.7.1. Transformace bakterií.....	41
4.7.2. Kultivace bakterií.....	42
4.7.3. Desintegrace bakteriálních buněk a izolace inkluzních tělísek.....	42
4.7.4. Izolace His ₆ GB1-Gly ⁻¹ IGF-II z inkluzních tělísek za využití afinitní chromatografie.....	43
4.7.5. Dialýza směsi získané z afinitní chromatografie.....	44
4.7.6. Enzymové dštěpené fúzního proteinu, His ₆ GB1.....	44
4.7.7. Izolace Gly ⁻¹ IGF-II.....	45
4.7.8. Purifikace Gly ⁻¹ IGF-II.....	45
4.8. Elektroforéza izolovaných směs.....	45
4.8.1. Příprava vzorků pro elektroforézu.....	46
4.8.2. Provedení elektroforézy.....	46

4.8.3. Vizualizace vzorků po elektroforéze.....	47
4.9. Vazebné testy analogů insulinu a IGF-II s IR a IGF-1R <i>in vitro</i>	48
4.9.1. Příprava analogů insulinu a IGF-II pro vazebné testování.....	48
4.9.2. Příprava buněk pro stanovení vazebné afinity k IR-A.....	48
4.9.3. Stanovení vazebné afinity analogů insulinu a IGF-II k IR-A.....	49
4.9.4. Příprava buněk pro stanovení vazebné afinity k IR-B a IGF-1R.....	49
4.9.5. Stanovení vazebné afinity analogů insulinu a IGF-II k IR-B a IGF-1R.....	50
5. VÝSLEDKY.....	52
5.1. Syntéza peptidů na pevné fázi.....	52
5.1.1. Manuální syntéza peptidů.....	52
5.1.2. Příprava peptidů na automatickém syntetizátoru.....	52
5.1.3. Konverze terminální karboxylové skupiny (Boc)-G-F-F-Y(OrBu)-T(OrBu)-P-K(Pac)- T(OrBu)-S(OrBu)-R(Pmc) na methylester.....	52
5.2. Purifikace připravených peptidů.....	52
5.3. Příprava desoktapeptid ^{B23-30} insulinu.....	53
5.4. Enzymová semisyntéza.....	54
5.4.1. Semisyntéza K(Pac) ^{B29} S ^{B31} -insulinu.....	54
5.4.2. Semisyntéza K(Pac) ^{B29} SR ^{B31-32} -K(Pac) ^{B29} SK(Pac)V ^{B31-33} - a K(Pac) ^{B29} SK(Pac)VS ^{B31-34} - insulin.....	55
5.4.3. Odstranění chránící fenylacetylové skupiny.....	56
5.4.4. Stanovení čistoty připravených analogů insulinu.....	59
5.5. Rekombinantní příprava Gly ¹ IGF-II.....	59
5.6. Vazebné testy analogů insulinu a IGF-II s IR-A, IR-B a IGF-1R <i>in vitro</i>	64
5.6.1. Testování vazebné afinity analogů insulinu a IGF-II k IR-A <i>in vitro</i>	64
5.6.2. Testování vazebné afinity analogů insulinu a IGF-II k IR-B <i>in vitro</i>	66
5.6.3. Testování vazebné afinity analogů insulinu a IGF-II k IGF-1R <i>in vitro</i>	67
6. DISKUSE.....	70
7. SOUHRN.....	74
Reference.....	75

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

α CT-peptid – C-koncový segment α -podjednotky insulinového receptoru odvozený z IR-A
Akt-kinasa – proteinová kinasa B
ATP - adenosintrisfosfát
Boc - *tert*-butyloxykarbonylová skupina
BSA - hovězí sérový albumin
DCM - dichlormethan
Dipea - *N,N*-diisopropylethylamin
DMF - *N,N*-dimethylformamid
doména PTB - doména vázající fosfotyrosin (z anglického označení „*phosphotyrosine binding domain*“)
doména PH – doména široce zastoupena u proteinů signalizačních kaskád (z anglického označení „*pleckstrin homology domain*“)
doména SH2, -3 - Src homologní oblast 2/3 (z anglického označení „*Src homology region 2/3*“)
DTT - dithiotreitol
EDT - ethandithiol
EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina
EGF - epidermální růstový faktor
Erk-kinasa - kinasaregulovaná extracelulárním signálem
ER - endoplasmatické retikulum
Fmoc - 9-fluorenyl-methyloxykarbonylová skupina
FTasa - farnesyltransferasa
Gab-1 - substrátový protein IR vázající se na Gbr2 1 (z anglického označení „*Gbr2 associated binding protein*“)
Gbr2 - vazebný protein růstového receptoru 2 (z anglického označení „*Growth factor receptor-bound protein 2*“)
GH - růstový hormon
Gly/NaOH pufr - glycinový pufr
GLUT4 - glukosové transportéry typu 4
GS - glykogensynthasa
GSK - glykogensynthasakinas
GTP - guanosintrisfosfát
HBTU - 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát
HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinylethansulfonová kyselina
HOBt - *N*-hydroxybenzotriazol
IGF-I, -II - růstový faktor podobný insulinu I, -II (z anglického označení „*insulin-like growth factor*“)
IGF-ICII - analog IGF-I, obsahující doménu C z IGF-II
IGF-IIIC - analog IGF-II, obsahující doménu C z IGF-I
IGFBP-1-6 - vazebné proteiny IGF 1-6
IGF-1R, -2R - receptor pro IGF-I, -II
IR - insulinový receptor
IR-A, -B - insulinový receptor isoformy A, -B
IRS - substrátové proteiny insulinového receptoru
IUBMB - International Union of Biochemistry and Molecular Biology
IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry
MAPK - mitogenem aktivovaná proteinová kinasa
PDGF - růstový faktor krevních destiček
MEK-kinasa - kinasa aktivující MAPK kinasy
PBS – fosfátový pufr fyziologického roztoku
PDK-1 - 3-fosfodependentní proteinová kinasa 1
PDK - pyruvátdehydrogenasa kinasa
PDP - pyruvátdehydrogenasa fosfatasa
His₆GB1 - B1 imunoglobulin vázající doména proteinu G streptokoka s připojenou polyhistidylovou sekvencí
PI-3 kinasa - fosfoinositol-3 kinasa
PKA - proteinová kinasa A
PKC - proteinová kinasa C
p62^{doc} - substrátový protein IR
p70S6K - ribosomální kinasa
Raf-kinasa - Ser/Thr proteinová kinasa
Ras protein /RasGTPasa - protoonkoprotein schopný vázat GTP (označovaný také jako p21^{ras})

RP-HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
Shc – adaptorové proteiny, obsahující homologní doménu SH2
SOS - výměnný faktor guaninového nukleotidu (z anglického označení „*son of sevenless*“)
*t*Bu - *tert*-butylová skupina
TFA - trifluoroctová kyselina
TIS - triisopropylsilan
TKR - tyrosinkinasový receptor
Tris - tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trt - tritylová skupina

Dále jsou užívány třípísmenné a jednopísmenné zkratky aminokyselin podle doporučení IUPAC-IUB. Pokud není uvedeno jinak, jedná se o aminokyseliny v L-formě.

1. ÚVOD

1.1. Historie a objev insulinu

Ačkoli od objevu insulinu ještě neuplynulo ani sto let, patří insulin k jednomu z nejlépe prostudovaných látek. Už o mnoho let dříve, než se o jeho objev v létě roku 1921 zasloužili Frederick Banting a Charles Best na univerzitě v Torontu, se mluvilo o důležitosti hormonu, který zajišťuje v těle pokles hladiny krevní glukosy, zejména ve spojitosti s onemocněním známým jako diabetes mellitus. Přestože záznamy, popisující stavy diabetických pacientů, jsou staré více než tři tisíce let, až do objevení insulinu v podstatě neexistovala žádná účinná metoda, jak s touto nemocí bojovat.

Roku 1898 učinili výrazný objev v léčbě diabetu fyziolog Oskar Minkowski a lékař Paul von Mering, kteří ukázali, že slinivka má mimo již známou produkci trávicích šťáv v organismu ještě další funkci a to produkci látky, která reguluje množství glukosy v krvi. Na základě svého objevu se pak marně pokoušeli léčit pacienty podáním pankreatinu, který získávali ze sušených zvířecích pankreatů [1]. O několik let později, v roce 1907, se lékař M. A. Lane podrobněji zabýval Langerhansovými ostrůvky a rozlišil v nich dva typy buněk, α - a β -buněk. O dva roky později na něj navázal Jean de Meyer, který přišel s myšlenkou, že by jedny z těchto buněk mohly tvořit údajný hormon, nutný ke snížení krevní glukosy, a pojmenoval ho insulin podle latinského označení *insula* (ostrov).

Extrahovat insulin se skutečně podařilo až Fredericku Bantingovi a Charlesu Bestovi v laboratoři Johna Macleoda. Díky pomoci Charlese Collipa byl insulin z hovězího pankreatu extrahován v tak čisté formě, že jej bylo možné v roce 1922 podat prvnímu pacientovi. Krátce po úspěchu se rozmohla masová extrakce insulinu a na konci roku 1923 už bylo insulinem léčeno více než 25 000 nemocných [2]. V roce 1923 byli Frederick Banting a John Macleod oceněni Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu [3].

V následujících letech se na insulin zaměřila pozornost mnoha proteinových chemiků. Jako u prvního proteinu u něj byla stanovena primární struktura aminokyselin [4]. Zasloužil se o to Frederick Sanger, který následně získal za metodu stanovení primární struktury proteinů Nobelovu cenu za chemii. O krystalizaci insulinu se poprvé pokusil John Abel v Baltimoru už v roce 1929 [5]. Následoval ho Jörgen Schlichtkrull, který vylepšil podmínky krystalizace a definoval dvě možná uspořádání se dvěma nebo čtyřmi zinečnatými ionty na šest molekul insulinu [6]. Trojrozměrnou strukturu insulinu pomocí X-paprskové krystalografie stanovila Dorothy Crowfoot Hodgkinová [7], která získala za své strukturní analýzy biologických látek v roce 1964 Nobelovu cenu za chemii [8].

Biosyntézu insulinu osvětlil v 70. letech 20. století Donald Steiner. Povedlo se mu detekovat jednořetězcový protein podobný insulinu a nazval ho proinsulin [9,10]. Enzymy zajišťující přeměnu proinsulinu na insulin byly objeveny téměř o dvacet let později [11].

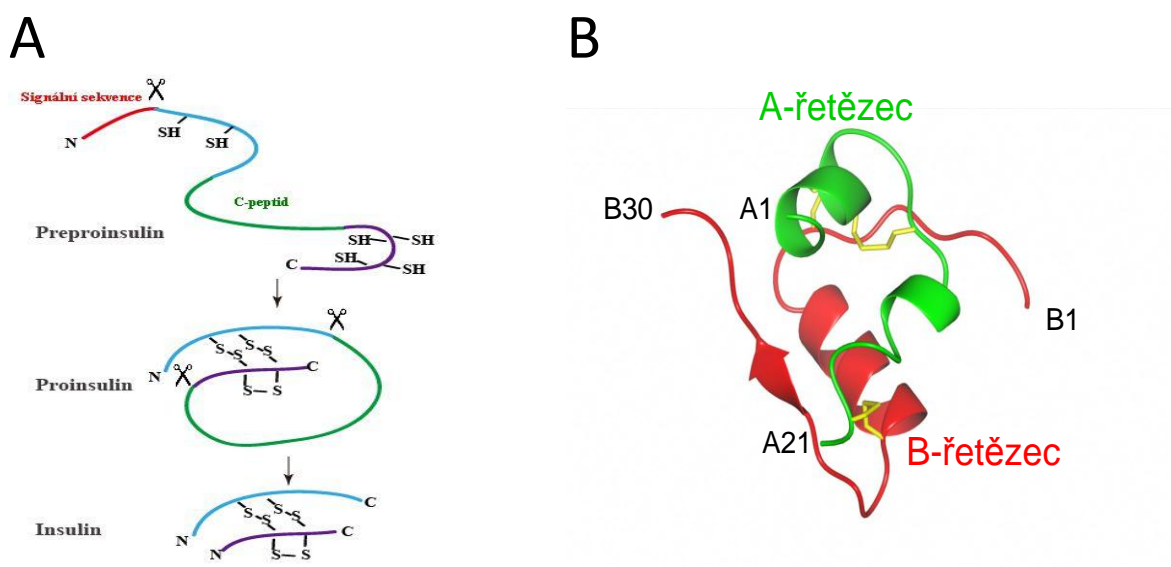
V současné době je známo mnoho peptidů, které mají podobný strukturní motiv jako insulin. Dohromady vytvářejí rodinu peptidových hormonů podobných insulinu a vyskytují se napříč mnoha organismy, kde mají rozmanité fyziologické funkce. Všichni členové rodiny se skládají ze dvou řetězců, při tvorbě vycházejí ze stejného předchůdce a mají striktně konzervované uspořádání disulfidických můstků uvnitř molekuly [12].

1.1. Insulin

Insulin je peptidový hormon, produkováný β -buňkami Langerhansových ostrůvků jako odpověď na zvýšení koncentrace glukosy v intersticiální tekutině. Konečná molekula insulinu se skládá ze dvou řetězců, A a B, které jsou vzájemně propojeny disulfidickými můstky cysteylových zbytků. V organismu vzniká ve formě preproinsulinu (viz obr. 1 (A), str. 12), který na N-konci molekuly obsahuje signální sekvenci následovanou řetězcem A, C-peptidem a řetězcem B. Signální sekvence umožňuje preproinsulinu vstoupit do endoplasmatického retikula (ER), kde dochází k jejímu odštěpení a následně „sbalení“ teď již molekuly proinsulinu za současného vytvoření tří disulfidických můstků. Řetězce A a B jsou spojeny mezi cysteylovými zbytky A^7 a B^7 , A^{20} a B^{19} . Třetí můstek se vytváří v rámci řetězce A mezi cysteiny v pozicích A^6 a A^{11} [13]. „Sbalený“ proinsulin putuje k cisternám Golgiho aparátu, kde se shlukuje a začíná konverze proinsulinu na insulin. Konverze spočívá v odštěpení C-peptidu z molekuly a jsou k ní nutné dva enzymy – endopeptidasa se specifitou podobnou trypsinu a exopeptidasa se specifitou podobnou karboxypeptidase B [14,15]. Hotový insulin vytváří v sekrečních granulích mikrokrystalky hexamerů koordinovaných okolo iontů Zn^{2+} . Na základě přijatého impulsu putují zralé sekreční granule (s hotovým insulinem) od Golgiho aparátu k plasmatické membráně β -buněk, se kterou splynou, a uvolní insulin do extracelulárního prostoru. Langerhansovy ostrůvky jsou protkány četnými kapilárami, zajišťujícími přístup vzniklým hormonům do krevního oběhu. Vyšší pH krve způsobí deprotonaci karboxylové skupiny postranních řetězců glutamových kyselin v pozici B^{13} , tím se oslabí koordinační vazba histidinů v pozici B^{10} okolo iontů Zn^{2+} a dojde k rozpadu hexameru [16]. Krví cirkuluje insulin v biologicky aktivním, monomerním uspořádání.

Jak bylo výše zmíněno, insulin se skládá ze dvou řetězců (A a B). Řetězec A obsahuje 21 aminokyselin včetně čtyř cysteinů v pozicích A⁶, A⁷, A¹¹ a A²⁰. Řetězec B je složen z 30 aminokyselin a obsahuje dva cysteiny v pozicích B⁷ a B¹⁹. Z terciární struktury se ukázalo, že řetězec A vytváří na svém konci N-terminální α -šroubovici (A²-A⁸) následovanou otáčkou (A⁹-A¹²) a druhou α -šroubovicí (A¹³-A¹⁹). Zatímco řetězec B vytváří centrální α -šroubovici (B⁹-B¹⁹) obklopenou z obou stran β -otáčkami (B⁷-B¹⁰ a B²⁰-B²³). C-konec řetězce B je ve struktuře β -skládaného listu (B²⁴-B²⁸) následovaného zbytky B²⁹ a B³⁰, které nemají pevnou strukturu [16,17]. N-terminální aminokyseliny řetězce B (B¹-B⁸) se mohou nacházet ve dvou konformacích, a to T-stavu (z anglického označení *tense*, napnutý) nebo R-stavu (z anglického označení *relax*, uvolněný). V T-stavu nemá N-konec řetězce B pevnou strukturu a je volně natažený, zatímco v R-stavu prodlužuje N-konec centrální α -šroubovici (vzniká α -šroubovice B¹-B¹⁹) [13]. V krystalovém uspořádání je C-konec řetězce B v blízkosti N-konce řetězce A a zároveň otáčka v rámci řetězce A zajišťuje, že jsou C- i N- konce molekuly orientovány stejným směrem (viz obr. 1 (B)).

Nepolární zbytky aminokyselin jako Ile^{A2}, Val^{A3}, Cys^{A11}, Leu^{A16}, Leu^{B11}, Leu^{B15} jsou skryty uvnitř molekuly a vytvářejí hydrofobní jádro insulinu. Molekula insulinu je mimo disulfidických můstků stabilizována řadou vodíkových vazeb a dalších interakcí, které dohromady vytvářejí poměrně pevnou terciární strukturu [17]. Pevnost terciární struktury je charakteristickým znakem i pro ostatní peptidy z rodiny peptidů podobných insulinu.



Obr.1: (A) Znáznornění tvorby molekuly insulinu od preproinsulinu k insulinu, upraveno dle [18]
(B) Terciární struktura insulinu v R-stavu, řetězec A je znázorněn zelenou a řetězec B červenou barvou.

1.3. Insulinový receptor

Insulin zprostředkovává svůj biologický účinek vazbou na insulinový receptor (IR). IR je transmembránový glykoprotein, patřící do rodiny tyrosinkinasových receptorů (TKR) [19]. Molekula insulinového receptoru vzniká, podobně jako insulin, ve formě prepro-receptoru, který je dále uvnitř ER glykosylován, „sbalen“, a následně vytváří homodimer za asistence chaperonů, calnexinu a caltrecilinu [20]. „Sbalený“ dimer putuje do Golgiho aparátu, kde jsou obě monomerní jednotky rozštěpeny na podjednotky α a β . Kompaktnost molekuly zůstává zachována, protože obě části jsou propojeny disulfidickými můstky Cys⁶⁴⁷ s Cys⁸⁶⁰.

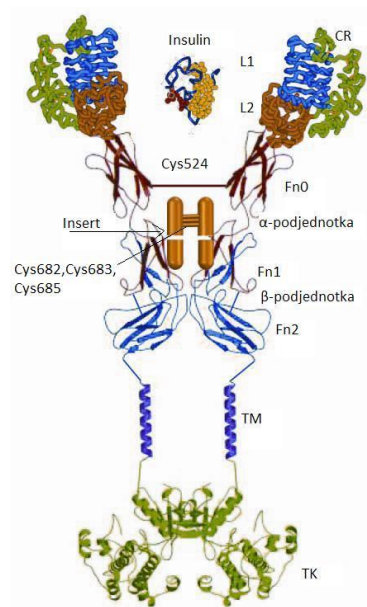
α -podjednotka receptoru se nachází v extracelulární oblasti a skládá se z několika domén. Na svém N-konci obsahuje dvě L-domény bohaté na leucin, L1 a L2 (označení je přejato z anglického *leucin-rich-repeat domain*), mezi ně je vložena oblast bohatá na cysteiny, CR-doména (z anglického názvu *cystein rich domain*). Následují 3 domény fibronektinu typu III označované jako Fn0, Fn1 a Fn2 (viz obr. 2, str. 14). Střední doména Fn1 je rozdělena oblastí insertu, která spojuje C-konec α -podjednotky s N-koncem β -podjednotky. β -podjednotka pokračuje *trans*-membránovou oblastí a v intracelulárním prostoru se nachází doména s tyrosinkinasovou aktivitou (aminokyseliny 980-1225). Tyrosinkinasová doména je obklopena z jedné strany juxtamembránovou oblastí (v oblasti blízko membrány), kde se shlukují substrátové proteiny receptoru (viz níže) a z druhé strany oblastí karboxylového konce proteinu, který obsahuje dvě vazebná místa pro fosforylované tyrosylové zbytky proteinů [21].

Stejně jako α - a β -podjednotky jsou oba monomery (každý je složen z α - a β -podjednotky) propojeny disulfidickými můstky mezi cysteylovými zbytky v pozicích 524, 682, 683 a 685, takže receptor je, bez ohledu na přítomnost či nepřítomnost ligandu, ve formě homodimeru, čímž se odlišuje od ostatních členů TKR, které dimerují až po aktivaci ligandem [19].

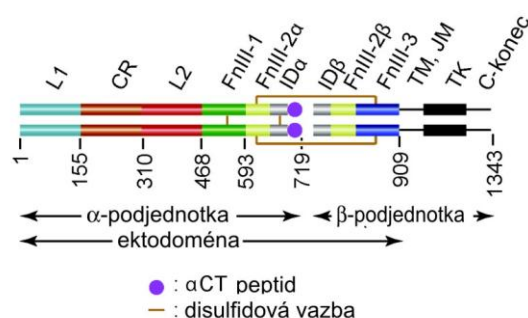
Gen pro insulinový receptor se skládá z 22 exonů a 21 intronů, které jsou následně odštěpeny. Alternativnímu sestřihu může podléhat i exon 11, čímž v buňce vznikají dvě různé isoformy receptoru, označované jako A a B. Exon 11 kóduje sekvenci 12 aminokyselin, která je obsažena v isoformě B insulinového receptoru (IR-B) a nikoli v isoformě A (IR-A) [22]. Tato sekvence 12 aminokyselin se nachází uvnitř C-koncového peptidu α -podjednotky (704-719) mezi pozicemi 716 a 717 IR-A (označováno jako α CT-

peptid) a je pravděpodobně zodpovědná za rozdílné funkce obou isoform [23]. Zastoupení obou typů receptoru se v různých tkáních liší. Isoforma B převládá v játrech, tukové tkáni a ve svalech, kde zprostředkovává zejména metabolický efekt insulinu. Isoforma A dominuje hlavně v centrální nervové soustavě, krvetvorných buňkách, placentární a fetální tkáni, ale i v ostatních tkáních. Je odpovědná zejména za antiapoptické a mitogenní účinky insulinu. Isoforma A také vykazuje rychlejší internalizaci, kratší recyklační čas [24] a slabší kinasovou aktivitu [25]. Ve fetální a tumorové tkáni je exprese isoformy A znatelně posílena [26].

A.



B.



Obr. 2: (A) Struktura insulinového receptoru, upraveno dle [21]; (B) Struktura insulinového receptoru s vyznačenou délkou řetězců jednotlivých domén, upraveno dle [27]

1.4. Aminokyseliny důležité pro funkci a strukturu insulinu

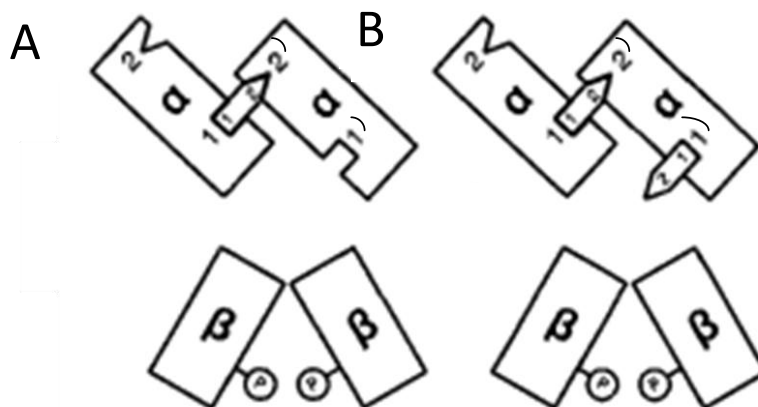
Během následujících let po zjištění primární struktury insulinu byla stanovena primární struktura insulinu více než sta druhů obratlovců [28], přičemž se ukázalo, že některé aminokyseliny jsou konzervované napříč evolučním vývojem a jiné oblasti naopak podléhají výraznému polymorfismu. Vysoká mezidruhovná proměnlivost aminokyselin může nasvědčovat o tom, že daná pozice uvnitř molekuly není nezbytná ani při syntéze molekuly ani při následné interakci s receptorem. Naopak evoluční a mezidruhovná stálost aminokyselin napovídá právě o jejich důležitosti v některém z těchto kroků.

Asi nepřekvapivě patří mezi konzervované aminokyseliny bezesporu všechny cysteiny (A^6 , A^7 , A^{11} , A^{20} , B^7 , B^{19}). Dále jsou mezi obratlovci plně konzervovány aminokyseliny Gly^{A1}, Ile^{A2}, Val^{A3}, Tyr^{A19}, Leu^{B6}, Gly^{B8}, Leu^{B11}, Val^{B12}, Gly^{B20} a Phe^{B24}. Na pozicích B¹³ a B²⁵ se vyskytují pouze konzervativní změny, při nichž je přibližně zachována velikost a polarita aminokyselin. V pozici B¹³ je v lidském insulinu Glu a u některých plazů nebo ryb je zaměněna za Asp. V pozici B²⁵ může být Phe nebo Tyr [17].

Od doby, kdy byla stanovena struktura insulinu, a bylo objasněno, že insulin účinkuje skrze vazbu na insulinový receptor, se pozornost vědců zaměřila na určení aminokyselin, které se účastní interakce s receptorem. Prvotní studie se zaměřily na stanovení povrchových aminokyselin molekuly s ohledem na stálost během evoluce. Přístup byl následně doplněn přípravou různě chemicky modifikovaných analogů a sledování vlivu modifikace při vazbě na receptor [29-32]. Ze studií vzešly aminokyseliny, které by se měly účastnit interakce s receptorem a byly souhrnně označeny jako klasické vazebné místo. Jedná se o aminokyseliny Gly^{A1}, Ile^{A2}, Val^{A3}, Glu^{A4}, Gln^{A5}, Tyr^{A19}, Asn^{A21}, Gly^{B8}, Val^{B12}, Tyr^{B16}, Gly^{B23}, Phe^{B24}, Phe^{B25} a Tyr^{B26} [33]. V následujících letech bylo dalšími studiemi objeveno druhé vazebné místo, obsahující aminokyseliny Leu^{A13}, Leu^{B17}, His^{B10}, Glu^{B13}, Ser^{A12} a Glu^{A17} [34,35]. Oblasti na povrchu molekuly, kterou aminokyseliny vytvářejí, se částečně překrývají s oblastmi potřebnými k agregaci. Většina postranních řetězců aminokyselin klasického vazebného místa se účastní tvorby dimerů a všechny aminokyseliny z druhého vazebného místa jsou zahrnuty ve tvorbě hexamerů [13,16].

1.5. Vazba insulinu na insulinový receptor

Každý monomer insulinového receptoru obsahuje dvě vazebná místa v rámci α -podjednotky. Vazebná místa jsou označena čísly 1 a 2 na jedné α -podjednotce, případně 1' a 2' na druhé α -podjednotce homodimeru. Vazebná místa 1 a 2 se vzájemně liší afinitou k molekule insulinu. Dle navrženého dvou-vazného modelu molekula insulinu přemostňuje a propojuje α -podjednotky obou monomerů [34]. Insulin se nejprve musí navázat do vazebného místa 1, což následně zvýší afinitu vazebného místa 2' na protější α -podjednotce [35] (viz obr. 3 A., str. 16). Vazbou ligandu z místa 1 do 2' se snižuje možnost alternativní vazby z místa 1' do 2 (viz obr. 3 B).



Obr. 3: (A) Propojení vazebných míst molekulou insulinu, upraveno dle [34]; (B) Ukázka nemožnosti navázání druhé molekuly insulinu do míst 1' a 2', upraveno dle [34]

Oblast klasického vazebného místa insulinu interaguje s vazebným místem 1 na receptoru. Disociační konstanta vazby je přibližně 6,4 nM [36]. Teprve nedávno byla rozřešena krystalová struktura primárního vazebného místa s navázaným insulinem, která naznačuje způsob interakce s receptorem. Ze studie vyplývá, že α -šroubovice řetězce B insulinu (B^7 - B^{21}) interaguje s centrální strukturou β -skládaného listu domény L1, a současně oba řetězce insulinu výrazně interagují se šroubovicí na C-konci α -podjednotky druhého monomeru receptoru, označovanou jako CT-peptid [27], která mimo jiné tvoří klíčový rozdíl mezi isoformami receptoru A a B. V krystalovém modelu je použit CT-peptid IR-A (α CT-peptid). Dle navázání molekul insulinu jsou v α CT-peptidu dvě klíčové aminokyseliny, reagující s insulinem – jedná se o His^{710} , který vstupuje do „kapsy“ vytvořené aminokyselinami insulinu Val^{A3} , Gly^{B8} , Ser^{B9} a Val^{B12} , a Phe^{714} , který je uvnitř hydrofobní „kapsy“ vytvořené Gly^{A1} , Ile^{A2} , Tyr^{A19} , Val^{B12} a Leu^{B15} .

Druhé vazebné místo na molekule insulinu interaguje se druhým vazebným místem na receptoru. K_d interakce je přibližně 400 nM [36]. Oblast je méně definována a ještě nebyla zjištěna struktura interakce. Z dosud známých hodnot se předpokládá, že se vazebné místo nachází na spojení mezi Fn0 a Fn1 na té α -podjednotce receptoru, jejíž α CT-peptid se účastní interakce v prvním vazebném místě [37].

1.6. Mechanismy signalizace

Navázáním insulínu na IR dojde ke konformačním změnám, které aktivují receptor a způsobí autofosforylaci tyrosinkinase domény β -podjednotky na tyrosylových zbytcích Tyr¹¹⁴⁶, Tyr¹¹⁵⁰ a Tyr¹¹⁵¹ [38]. Změnou konformace současně receptor získá schopnost fosforylovat exogenní substráty a tato schopnost se zvyšuje s přítomností ATP a bivalentních kationů (Mg^{2+} , Mn^{2+}) [39]. Po aktivaci se v okolí receptoru začínají shlukovat a fosforylovat substrátové proteiny IRS1-6 (z anglického označení „*insulin receptor substrate*“), p62^{doc}, Gab-1 (odvozeno z anglického názvu „*Grb2 associated binder-1*“) a Shc proteiny (z anglického názvu „*SH2 domain containing*“). Jedná se o látky, které se nacházejí v okolí receptoru a které je IR schopen fosforylovat svou kinasovou aktivitou. I když substrátové proteiny, nevykazují společnou sekvenční homologii, spojuje je schopnost zesilovat signál receptoru a předávat jej dál efektorovým proteinům [40]. Jako první byly objeveny IRS1 a IRS2, které jsou produkovány v buňkách tukové a svalové tkáně, v buňkách srdce, mozku, jater, ledvin, vaječníků a prsní žlázy, kde plní rozmanité fyziologické funkce [41]. IRS3 se tvoří pouze u hlodavců v buňkách tukové tkáně a mozku [42]. Tvorba IRS4 převládá hlavně v zárodečné tkáni a buněčných liniích [43]. Další substrátové proteiny, IRS5 a 6, jsou méně distribuované v organismu. IRS5 vzniká v játrech a ledvinách, kde se pravděpodobně podílí na vytváření zásob glykogenu pro organismus. K expresi genu pro IRS-6 dochází ve velké míře ve svalech [44]. Dalšími substrátovými proteiny, které mají sice rozdílné vlastnosti oproti IRS1-6, ale dokážou přenášet signál z IR do nitra buňky, jsou p62^{doc}, Gab-1 a několik proteinů, obsahujících doménu SH2 (z anglického označení „*Src homology 2 domain*“) [43]. Jedním ze společných znaků všech substrátových proteinů je doména PH (odvozeno z anglického „*pleckstrin homology domain*“), nacházející se na N-konci řetězce molekuly. Doména PH je typická pro molekuly, účastníci se vnitrobuněčné signalizace, a díky ní mohou substrátové proteiny interagovat s insulinovým receptorem. Vedle této domény, dále od N-konce molekuly, se nachází doména PTB (odvozeno z anglického „*phosphotyrosine binding domain*“), kterou substrátové proteiny interagují s vnitrobuněčnou juxtamembránovou oblastí β -podjednotky receptoru a udržují se tak v jeho blízkosti. Doména PTB se váže na fosforylovaný sekvenční motiv Asn-Pro-X-Tyr receptoru [45]. U IRS1-6 je tato oblast konzervovaná, u p62^{doc} rozpoznatelná a u Gab-1 úplně chybí [40]. C-konec každého z IRS proteinů obsahuje od několika (IRS3) až po desítky (IRS1/2) rozpoznatelných motivů

s tyrosylovým zbytkem, který ve fosforylovaném stavu může interagovat se signalizačními molekulami. Aktivovaný insulinový receptor rozpoznává a svou kinasovou aktivitou fosforyluje tyrosylové zbytky uvnitř sekvenčních motivů Tyr-X-X-Met, Tyr-Val-Asn-Ile a Tyr-Ile-Asp-Leu (shrnutí v [46]).

1.6.1. Metabolické účinky insulinu

Ke spuštění metabolických účinků insulinu dochází při aktivaci fosfoinositol-3 kinasy (PI-3 kinasa). PI-3 kinasa se skládá ze dvou domén, a to 110 kDa-katalytické podjednotky a 85 kDa-regulačního proteinu, přičemž každá z podjednotek se v organismu vyskytuje v několika isoformách [47].

Substrátové proteiny IR se vážou fosforylovanou oblastí Tyr-X-X-Met na domény SH2 regulačního proteinu PI-3 kinasy [48]. Pro aktivaci PI-3 kinasy je nutná fosforylace obou jejích SH2-domén [49]. Při interakci s fosforylovaným substrátem rozpoznává SH2-doména fosforylovaný motiv Tyr-X-X-Met. Současně záleží i na okolních posilujících, případně inhibujících interakcích, které zvyšují selektivitu aktivace PI-3 kinasy [50]. V malé míře může být PI-3 kinasa aktivována přímo tyrosinkasovou doménou insulinového receptoru, jedná se však spíše o doprovodný jev ve srovnání s aktivací přes substrátové proteiny.

Katalytická podjednotka aktivní PI-3 kinasy je Ser/Thr-kinasa, která současně fosforyluje hydroxylové skupiny fosfoinositolu na třetí pozici inositolového kruhu. Přeměna fosfoinositolu-4,5-bisfosfátu na fosfoinositol-3,4,5-trisfosfát aktivuje několik Ser/Thr-kinas. Mezi nejdůležitější patří 3-fosfodependentní proteinová kinasa 1 (PDK-1) a Akt-kinasa. Obě kinasy obsahují doménu PH, prostřednictvím které se váží na fosfoinositol-3,4,5-trisfosfát a dostávají se tak do vzájemné blízkosti. V Akt-kinase navíc vazbou dochází k rozsáhlým konformačním změnám, které vyústí v mnohonásobné zvýšení afinity pro interakci s PDK-1. PDK-1 předává signál i mnoha dalším kinasám, jakými jsou PKC, p70S6K, PKA a další [51].

Akt-kinasu fosforyluje PDK-1 na Thr³⁰⁸. Úplná aktivace Akt-kinasy vyžaduje ještě dodatečnou fosforylaci na Ser³⁴⁸. Není dosud zcela jasné, jaká molekula ji zprostředkuje. Na základě současných poznatků se ale zdá, že by to mohl být Rictor (odvozeno z anglického názvu „*rapamycin insensitive companion of mTOR*“) [43].

Aktivace Akt-kinasy je jeden z nejdůležitějších kroků signalizace insulinu, vedoucí k jeho metabolickým účinkům. Akt-kinasa zajistí aktivaci malé GTPasy z Rab-rodiny

proteinů přesun váčků s glukosovými transportéry, GLUT4, k plasmatické membráně a tím zvýší její prostupnost pro glukosu [52].

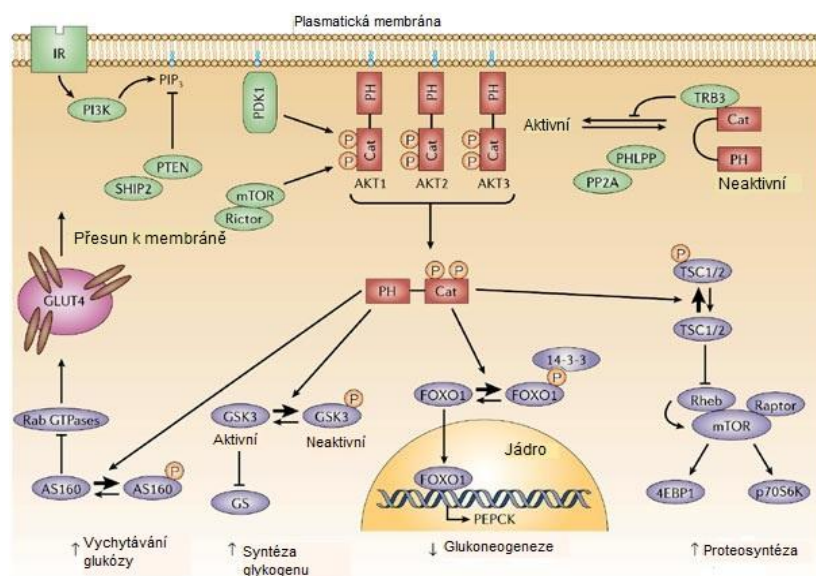
Akt-kinasa dále deaktivuje glykogensynthasu-kinasu (GSK-3) která inhibuje glykogensynthasu (GS) [53]. Neblokovaná GS přeměňuje glukosu na glykogen a vytváří tak zásobní formu glukosy.

Insulin podněcuje prostřednictvím Akt-kinasy stimulaci syntézy proteinů na několika úrovních a to z krátkodobého i dlouhodobého hlediska. Při krátkodobém posílení se jedná zejména o stimulaci faktorů proteosyntézy, jakými jsou elongační faktor (eIF2) [54], eukaryotický iniciační faktor (eIF4E), ribosomální kinasa (p70S6K) a translační elongační faktor (eEF2). K dlouhodobému posílení syntézy proteinů přispívá zejména indukovaná exprese ribosomálních proteinů, vedoucích ke zmnožení syntetického aparátu, patrně prostřednictvím p70S6K (shrnutí v [55]).

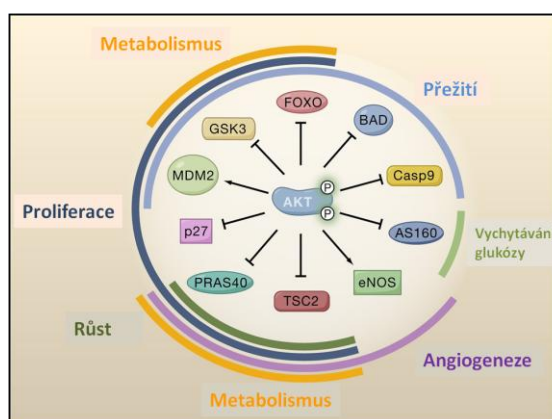
Insulin má přímý vliv má na glukokinasu, jeden z klíčových genů glykolýzy. Zvyšuje expresi genu pro glukokinasu a zároveň stimuluje její aktivitu [56]. Obdobným způsobem kontroluje a naopak snižuje expresi proteinů důležitých při glukoneogenezi (shrnutí v [43]).

Insulin je také pravděpodobně jedním z nejdůležitějších hormonálních faktorů, ovlivňujících lipogenezi. Zvýšením vnitrobuněčné koncentrace glukosy se hromadí produkt metabolismu glukosy, acetyl-koenzym A, který je acetyl-koenzymA-karboxylasou převeden na malonyl-koenzym A, základní stavební jednotku syntézy mastných kyselin. Hladinu acetyl-koenzymu A zvyšuje i vyšší aktivita pyruvátdehydrogenasy a acetyl-koenzymA-karboxylasy. Oba enzymy jsou stimulovány vazbou insulinu na IR, i když mechanismy dějů nejsou zcela objasněny. Pyruvátdehydrogenasa je aktivní v defosforylovaném stavu. O její fosforylaci či případné defosforylaci rozhoduje převaha pyruvátdehydrogenasy kinasy (PDK) či pyruvátdehydrogenasy fosfatasy (PDP). Insulin prostřednictvím Akt-kinasy patrně přispívá ke stimulaci PDP [57] i inhibici PDK [58]. Stejně jako pyruvátdehydrogenasa je i acetyl-koenzymA-karboxylasa aktivní v defosforylovaném stavu, který v buňkách převládá jako odpověď na stimulaci insulinem [59]. Na obr. 4 A (str. 20) je znázorněna signalizační kaskáda z IR vedená přes aktivaci Akt-kinasy, v části B je pak shrnut vliv Akt-kinasy na klíčové účastníky buněčných pochodů.

A



B



Obr. 4: (A) Signalizační kaskáda vedená přes aktivaci Akt kinasy, jako Cat je označena katalytická doména a jako PH regulační podjednotka Akt kinasy. PIP₃ označuje fosfoinositol -3,4,5,-trisfosfát, GS je glykogensynthasa, PI3K označuje PI-3 kinasu, FOXO jsou transkripční faktory účastníci se exprese genů, ovlivňujících buněčný růst, proliferaci, diferenciaci, TSC2- tuberin, upraveno dle [43]; (B) Shrnutí vlivu Akt na jednotlivé buněčné pohody. Casp9 – kaspasa 9, eNOS- endoteliální synthasa NO, PRAS40- 40 kDa na prolin bohatý substrát Akt kinasy, MDM2- ubikvitinová ligasa pro p53; upraveno dle [60].

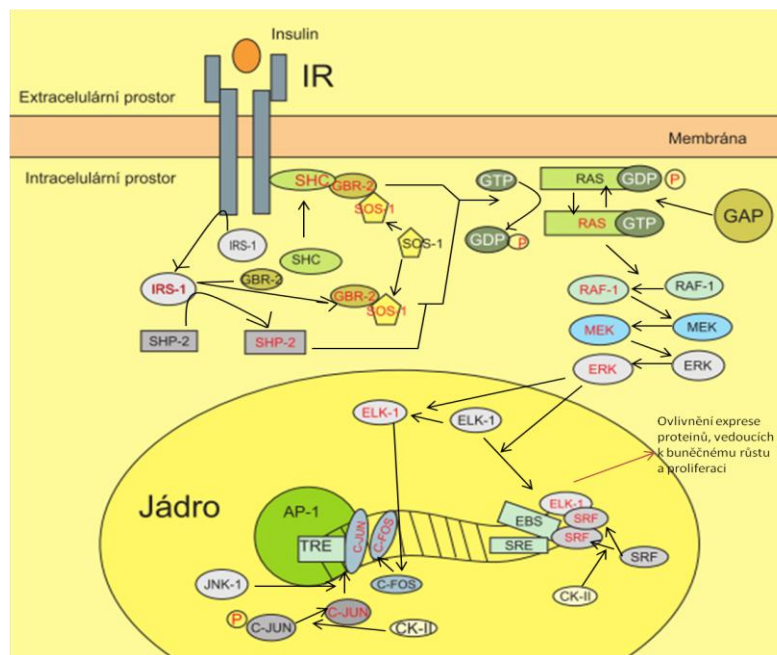
1.6.2. Mitogenní účinky insulinu

Druhá hlavní signalizační kaskáda, spuštěná z aktivovaného IR, začíná také aktivací substrátových proteinů (IRS, Shc) (viz obr. 5, str. 22). Aktivované substrátové proteiny obratem předávají signál adaptorovému proteinu Gbr-2, který následně naváže SOS (označení pochází z anglického názvu „Son of sevenless“) k plasmatické membráně. SOS je výměnný protein a katalyzuje disociaci GDP z Ras-GTPasy. V některých buňkách převažuje signalizace přes Shc v jiných zase přes IRS1-6 [61]. Patrně dochází ke kompetici, a to jak o vazbu substrátu na receptor, tak o navázání adaptorového proteinu

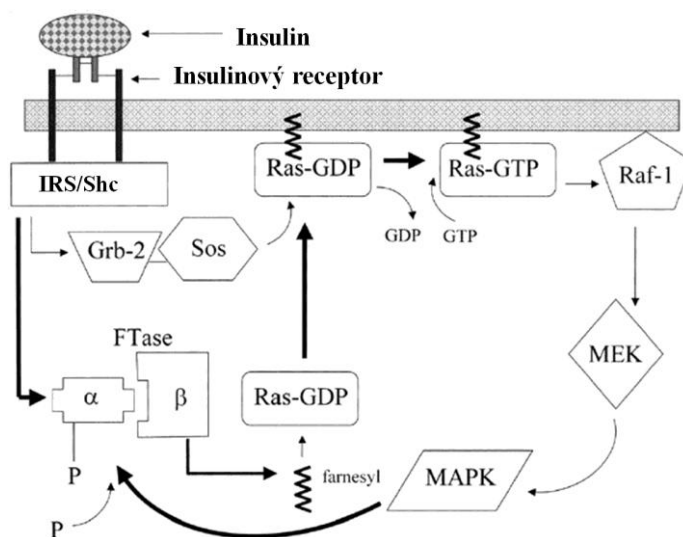
Gbr-2. Aby mohl SOS katalyzovat disociaci GDP z Ras-proteinu, musí být Ras-protein ukotven v membráně. Jeho upevnění k membráně je možné díky lipidové modifikaci C-konce proteinu, připevněním farnesyly k cysteylovému zbytku v sekvenci Cys-Ala-Ala-X. Reakce je katalyzována farnesyltransferasou (FTasou). Po navázání farnesyly dojde k odštěpení C-koncových aminokyselin a methylovaní karboxylové skupiny cysteinu. Vytvořená lipidová kotva následně umožní zanoření Ras-proteinu do membrány. Aktivace Ras-proteinu se dále účastní tyrosinová fosfatasa, SHP2 (z anglického označení „*SH2-containing tyrosine-specific protein phosphatase*“), která získává signál od substrátových proteinů – IRS1-6 či Gab-1 [62,63] a zdá se, že by mohla být pojítkem mezi insulinovým receptorem a FTasou, i když přesný mechanismus dějů není dosud znám. Současně bylo potvrzeno, že aktivace FTasy je výhradně vlastností insulinu [64,65]. Farnesylovaný Ras-protein je znázorněn na obr. 6 (str. 22).

Farnesylovaný Ras-protein se hromadí na vnitřní straně membrány a je připraven interagovat s výměnným proteinem, SOS, a spustit disociaci GDP z Ras-proteinu [66]. Po uvolnění GDP z Ras-proteinu se samovolně, díky vyšší koncentraci v cytoplasmě, na Ras-GTPasu naváže GTP. Aktivní Ras-GTPasa spouští mitogenem aktivovanou proteinovou kaskádu kinas, MAPK kaskádu. Aktivace každé kinasy je složitý sled dějů, který vyžaduje stimulaci na několika úrovních. Ras-GTPasa předává signál Raf-kinase, která dále aktivuje MEK-kinasu. Ta následně fosforyluje Erk-kinasu na threonylovém a tyrosylovém zbytku uvnitř konzervovaného sekvenčního motivu Thr¹⁸³-Glu¹⁸⁴-Tyr¹⁸⁵ [67]. Erk-kinasa vyniká svou širokou substrátovou specifitou [68]. Po aktivaci buď zůstává v cytosolu nebo vytváří dimery a vstupuje do jádra buňky. Uvnitř jádra může Erk-kinasa fosforylovat rozmanité druhy substrátu včetně jaderných transkripčních faktorů [69,70], což vede k expresi proteinů, potřebných pro průchod buněčným cyklem směrem k proliferaci či diferenciaci buňky. Signalizace vedená z IR přes aktivaci Erk-kinasy je znázorněna na obr. 5 (str. 22).

K regulaci buněčného cyklu může docházet i signalizační drahou přes Akt-kinasu, která má jinak převážně metabolické účinky [71]. Mimo jiné se Akt-kinasa výrazně účastní zabránění vstupu buňky do apoptosy. Skrze kaskádu dějů podporuje anti-apoptické proteiny (zejména Bcl-XL) [72], snižuje tvorbu a inhibuje aktivitu pro-apoptických látek [73] či přímo inhibuje kaspasové proteasy, klíčové účastníky apoptosy. Shrnutí účinků Akt-kinasy je znázorněno na obr. 4 B (viz str. 20).



Obr. 5: Přehled signalizace vedené z IR přes aktivaci Erk-kinasy k mitogenním účinkům insulinu. Červeně jsou znázorněny aktivované a černě neaktivované molekuly, upraveno dle [74].



Obr. 6: Znázornění farnesyloace Ras-proteinu, upraveno dle [75].

1.7. Hyperinsulinémie

Při narušení správné funkce insulinu může dojít ke snížení biologické odpovědi a vzniku insulinové rezistence. K vyvolání stejného metabolického účinku je pak zapotřebí větší množství insulinu. Snížení biologické odpovědi může být spojeno s přítomností vysokých koncentrací neesterifikovaných mastných kyselin, zánětlivých cytokinů, některých aminokyselin či samotného insulinu v krevním oběhu. Neopomenutelnou úlohu

při vzniku rezistence může mít i buněčný stres a další faktory [76]. Patrně ve všech případech dochází k nadměrné aktivaci Ser/Thr-intracelulárních kinas, nejčastěji protein kinasy C (PKC), která vede k fosforylaci serylových zbytků substrátových proteinů insulinového receptoru. K fosforylaci dochází v pozicích, které buď zabraňují navázání IRS na receptor nebo blokují fosforylaci tyrosylových zbytků a tím přenos signálu [77]. Současně může docházet i k fosforylaci serylových a threonylových zbytků uvnitř intracelulární oblasti β -podjednotky receptoru následované snížením jeho tyrosinkinasové aktivity [78,79].

V případě insulinové rezistence způsobené přítomností vysokých koncentrací mastných kyselin se diskutovalo o možnosti, že pokles oxidace glukosy spočívá v upřednostňování oxidace mastných kyselin. Nadbytek acetyl-koenzymu A a NADH v mitochondriích by měl blokovat aktivitu enzymů důležitých při transportu a metabolismu glukosy (pyruvátdehydrogenasa, fosfofruktokinasa a hexokinasa) [80]. Následně se ale ukázalo, že i v případě volných mastných kyselin spočívá problém v signalizaci insulinu – fosforylací IRS1-6 a IR [81].

Insulinová rezistence je omezena pouze na metabolickou dráhu [79], protože signalizační dráha, vedoucí přes aktivaci Erk-kinasy, může být iniciována i Shc a dalšími substrátovými proteiny. Také fakt, že insulinová rezistence oslabuje či úplně znemožňuje předání signálu mezi IRS a PI-3 kinasou, zvyšuje možnost interakce mezi IRS a adaptorovým proteinem Gbr-2 a tedy posiluje mitogenní signalizaci. Zvýšená aktivita Erk-kinasy navíc vede k fosforylaci serylových zbytků proteinu IRS-1, které se nacházejí v blízkosti vazebného místa pro PI-3 kinasu, a tím se ještě více oslabuje metabolická signalizační dráha [77].

Organismus se snaží kompenzovat oslabené snižování krevní glukosy nadprodukcí insulinu z β -buněk Langerhansových ostrůvků. Trvalá přítomnost insulinu ale zároveň zvyšuje účinnost signalizace růstových faktorů (IGF, EGF, PDGF), protože, jak bylo výše zmíněno, je výhradní vlastností insulinu aktivovat FTasu a stimulovat tak farnesylaci Ras-GTPasy, nezbytnou k aktivaci Ras-Raf-Mek-Erk kaskády kinas [65]. V přítomnosti insulinu se tak naváže množství Ras-proteinu k membráně, kde je připraven k aktivaci, a signalizace ostatních růstových faktorů, vedoucí k aktivaci MAPK-kaskády kinas, je citlivější. Stejný dopad jako vyšší koncentrace insulinu v krvi má i vyšší exprese insulinového receptoru na povrch buněk. Vede ke snadnější aktivaci mitogenních signalizačních drah všemi růstovými faktory. Nebezpečí permanentní přítomnosti

vysokých koncentrací insulínu prokazují i epidemiologické studie, dle kterých je hyperinsulinemie důležitým rizikovým faktorem pro vznik škály zhoubných nádorů [82].

1.8. Růstové faktory podobné insulínu, IGF

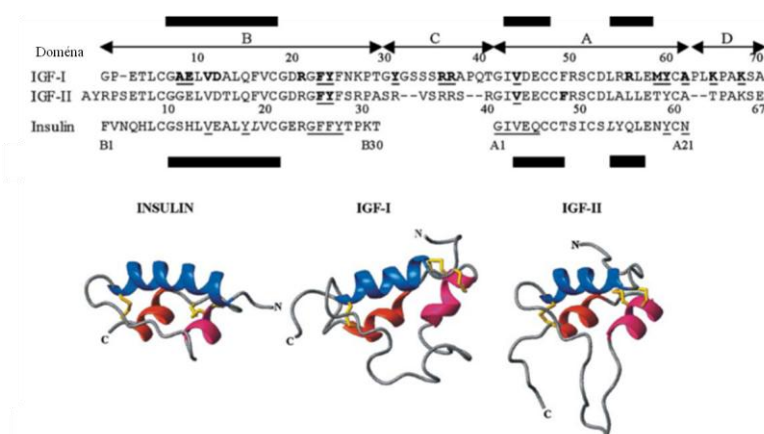
V organismu se vyskytují látky, které podporují buněčný růst, proliferaci a diferenciaci, souhrnně označované jako růstové faktory (GF). Růstové faktory obvykle působí na více typů buněk a mají nezastupitelné postavení v regeneraci a obnově tkání. Mezi nejrozšířenější patří epidermální růstový faktor (EGF), růstový faktor podobný insulínu (IGF), placentární růstový faktor (PGF), růstový faktor fibroblastů (FGF), růstový faktor krevních destiček (PDGF) a další. Růstový faktor podobný insulínu je v organismu zastoupen ve dvou formách; IGF-I a IGF-II.

Stejně jako v případě insulínu existují v organismu receptory, skrze které molekuly IGF zprostředkovávají svůj biologický účinek (IGF-1R a IR-A). Insulin a IGF spolu s transmembránovými receptory (IR-A/-B a IGF-1R) a vazebnými proteiny vytvářejí spleť systém důležitý pro růst a rozvoj celého organismu, stejně tak jako pro zachování funkcí mnoha buněk. Exprese genu pro IGF-I je řízena růstovým hormonem, částečně insulínem a dalšími hormony. K tvorbě IGF-I dochází zejména v játrech, odkud se dostává do krevního oběhu [83]. Produkovat ho mohou ale i další orgány, jeho působení pak může být parakrinní i autokrinní. Tvoří se hlavně v postnatálním období, kdy se jeho koncentrace zvyšuje přibližně na dvojnásobek [84]. Exprese IGF-II je také řízena růstovým hormonem, ale již ne tak výrazně jako IGF-I. V některých organismech se IGF-II tvoří jen v období fetálního růstu, po narození jeho plasmatická koncentrace výrazně klesá. V lidském organismu je syntetizován v různých tkáních během celého života, a jeho hladina naopak znatelně převyšuje koncentraci IGF-I [85,86]. Při fyziologické koncentraci (IGF-I přibližně 20 nM a IGF-II 60 nM [87]) růstové faktory stimulují proliferaci a v některých tkáních diferenciaci, avšak při vysokých koncentracích vykazují i metabolické účinky podobné insulínu. IGF-I je považován za hlavního prostředníka působení růstového hormonu, zatímco biologická úloha IGF-II není stále zcela objasněna. Zvýšená koncentrace obou růstových faktorů je spojena s rizikem vzniku nekontrolované proliferace buněk a rozvojem rakoviny [84].

Cirkulující IGF se vážou na několik vazebných proteinů, označovaných jako IGFBP1-6 (označení přejato z anglického názvu „*IGF binding protein*“). Vazebné proteiny upravují volné, a tedy biologicky aktivní, koncentrace cirkulujících molekul IGF, přičemž

za fyziologických podmínek se přibližně 99 % IGF vyskytuje v komplexu s vazebnými proteiny [88]. K uvolnění IGF z komplexu může docházet degradací vazebného proteinu, vazbou IGFBP na složky extracelulární matrix (např. IGFBP5 se váže na thrombospondin-1 či osteospondin, což následně výrazně sníží jeho afinitu k IGF), případně změnou afinity k molekule IGF [89].

IGF-I i II jsou jednořetězcové molekuly složené ze 70, respektive 67 aminokyselin. Struktura molekul je rozdělena do čtyř domén B, C, A a D (postupně od N-konce molekuly). Domény A a B obou molekul IGF mají přibližně 50% homologii s A a B řetězcem insulínu. Doména C propojuje C-konec domény B s N-koncem domény A a doména D je připojena k C-konci domény A (viz obr. 7). Terciární struktura IGF se podobá terciární struktuře prekursoru insulínu, proinsulínu. Majoritním znakem sekundárních struktur IGF jsou tři α -šroubovice. První se vytváří v rámci domény B, druhá a třetí uvnitř domény A. Uspořádání v rámci domén C a D je flexibilnější. Stabilitu terciární struktury zajišťují tři disulfidické můstky, propojující cysteylové zbytky, jejichž uspořádání je konzervované v rámci celé rodiny hormonů podobných insulínu [90].



Obr. 7: V horní části obrázku jsou znázorněny sekvence IGF – I, -II a insulínu s vyznačenými doménami, ve spodní části jsou uvedeny terciární struktury růstových faktorů a insulínu. Modrou barvou je vyznačena centrální α -šroubovice domény B (respektive řetězce B) růžovou a červenou barvou jsou znázorněny α -šroubovice uvnitř domény A (řetězce A). Disulfidické můstky jsou vyznačeny žlutou barvou. Upraveno podle [90].

1.9. Receptory pro IGF

Podobně jako insulín oba růstové faktory zprostředkovávají svůj biologický účinek vazbou na transmembránový receptor. V organismu se vyskytují dva typy receptorů IGF a to IGF-1R a IGF-2R. IGF-1R patří stejně jako IR do rodiny receptorů s tyrosinkinasovou aktivitou a jeho struktura je velmi podobná insulínovému receptoru. IGF-2R známý také

jako manosa-6-fosfátový receptor nemá žádnou doposud popsanou signalizační funkci. Na IGF-2R se s dostatečnou afinitou dokáže navázat jen IGF-II, s nízkou afinitou IGF-I a insulin se na receptor neváže vůbec. Po navázání ligandu dochází k internalizaci receptoru a degradaci molekuly, z čehož plyne, že nejméně jednou úlohou receptoru je snižování koncentrace biologicky aktivního IGF-II v krvi [85]. Ztráta exprese genu pro IGF-2R byla objevena u několika typů nádorů [91,92].

IGF-1R, jak již bylo výše zmíněno, patří do rodiny receptorů s tyrosinkinasovou aktivitou. Jeho struktura je velmi podobná struktuře insulinového receptoru, což poukazuje na společný původ obou molekul. Ačkoli hlavní signalizační dráhy aktivované z obou receptorů si jsou podobné, existují drobné rozdíly, které nakonec vyústí v odlišné biologické účinky. Při aktivaci IR je možné říci, že signalizace vedena přes fosforylaci Akt-proteinu (IR-B) vyústí převážně v metabolický efekt a naopak signalizace přes fosforylaci Erk-proteinu (IR-A) převážně v mitogenní efekt. Při aktivaci IGF-1R dochází téměř pouze k mitogennímu efektu, a to ať je signál veden přes fosforylaci Akt či Erk [93].

Sekvenční homologii IR a IGF-1R se pohybuje v rozmezí 27-84 % v závislosti na porovnávání domén receptoru. Největší homologie je v rámci tyrosinkinasové domény, kde dosahuje až 84 %. Naopak nejmenší je v extracelulární oblasti, což se projevuje rozdílnou afinitou k ligandu. Hodnoty vazebných afinit jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1. Vazebné afinity insulinu, IGF-I a IGF-II k IR a IGF-1R; hodnoty naměřené v laboratoři Dr. Jiráčka

	<i>IR-A</i> <i>K_d [nM]</i>	<i>IR-B</i> <i>K_d [nM]</i>	<i>IGF-1R</i> <i>K_d [nM]</i>
Insulin	0,2 - 0,45	0,52	292
IGF-I	27,1	300-500	0,24
IGF-II	7	200	5,11

Druhá oblast s nižší homologií je C-konec β -podjednotky. Dle některých studií vyplývá rozdíl signalizačních drah po aktivaci obou receptorů právě z různé afinity vnitrobuněčné oblasti k substrátovým proteinům, což je navíc posíleno jejich různým uspořádáním v okolí receptoru [94,95]. K rozdílnému působení hormonů jistě přispívá i preference jednotlivých tkání exprimovat určitý typ receptoru (IR-A, IR-B, IGF-1R). V játrech a tukové tkáni se vyskytuje hlavně IR-B (játra: 75-90 %; tuková tkáň: 60-80 %). Ve svalové tkáni je výskyt obou isoform stejný (zastoupení IR-B: 45-70 %) [96,97].

koncentracemi IGF a zvýšenou expresí zejména IR-A a IGF-1R na povrchu buněk. Obezita není ale jediná příčina vzniku hyperinsulinémie, může to být i následek exogenní léčby insulinem [102].

Obě zmíněná fakta motivují ke studiu molekul insulinu a růstových faktorů (IGF-I/II), které vedou k určení strukturních oblastí, odpovědných za vazbu k jednotlivým typům receptorů (IR-A, IR-B a IGF-1R). Studium by mělo vést například k přípravě analogů insulinu, u nichž převládá metabolický efekt, a antagonistů IGF-II, které potlačují mitogenní efekt.

Předešlé studie odhalily některé faktory, které se vyskytují pouze při signalizaci vedoucí k mitogenním respektive metabolickým účinkům [24,26,103,104]. Jak již bylo výše zmíněno, ke spouštění metabolické dráhy dochází zejména po aktivaci isoformy B IR. Isoforma A je naopak spojena hlavně s aktivací mitogenní dráhy. Dále rozhoduje kinetika asociace ligandu na receptor a jeho následné disociace (k_{on} a k_{off}). Metabolický efekt vazby je spojen s rychlým navázáním molekuly na receptor a rychlou disociací z něj. Pomalá vazba ligandu a jeho delší setrvání na receptoru vede spíše k mitogenní odpovědi [105]. Zajímavá je rozdílná signalizace molekul IGF-II a insulinu prostřednictvím insulinového receptoru, IR-A. Během studií prováděných na R⁻buňkách transfekovaných lidským IR-A bylo zjištěno, že aktivace je odlišná zejména v době dosažení maximální fosforylace substrátů a jejího trvání. Na úrovni substrátových proteinů dosahuje insulin maximálních hodnot rychleji než IGF-II a současně i signál rychleji odeznívá. Výjimku tvoří Shc proteiny, kdy se po aktivaci insulinem maximální fosforylace objeví nejen rychleji, ale udržuje se i déle. Aktivace Erk-kinasy je zpožděná a nepatrně slabší po vazbě IGF-II ve srovnání s insulinem. Největší rozdíl je v aktivaci PI-3 kinasy, kdy IGF-II dosahuje méně než 50 % účinku insulinu. Odlišná signalizace se dle očekávání projevila v lepší schopnosti buněk „vychytávat“ 2-deoxyglukosu po vazbě insulinu a navzdory slabší míře aktivace všech substrátů v silnějším mitogenním efektu po vazbě IGF-II [26].

Klíčové ke správnému pochopení celého systému a jeho regulace je identifikace oblastí receptoru, na které se musí ligand navázat, aby došlo buď k metabolické nebo mitogenní odpovědi, stejně jako zmapování dějů, ke kterým dochází bezprostředně po vazbě ligandu. Z 51 aminokyselin insulinu uvnitř řetězců A a B je 28 odlišných v porovnání s odpovídajícími pozicemi u molekul IGF. Vytvořením analogů insulinu s bodovými mutacemi odvozenými z IGF-I nebo IGF-II se ukázalo, že pouze záměna 5 aminokyselin (Thr^{A8}→Phe (F), Ile^{A10}→Ser (S), His^{B5}→Thr (T), Tyr^{B16}→Gln (Q), a

Tyr^{B26}→Phe (F)) vedla k více než dvojnásobnému snížení afinity k IR-A (testováno na IM-9 buňkách) [106]. Není asi náhodou, že všechny vložené aminokyseliny jsou přítomné jak v IGF-I, tak v IGF-II. Nejvýrazněji se afinita snížila u analogu Q^{B16}-insulinu, kdy je původní tyrosin nahrazen glutaminem. Na druhou stranu 3 substituce aminokyselin vedly ke zvýšení afinity k IR-A oproti lidskému insulinu (His^{B10}→Glu (E), Asn^{A18}→Thr (T) a Ala^{B14}→Thr (T)), přičemž Thr na pozici A¹⁸ a B¹⁴ jsou zastoupeny pouze u IGF-II [106,107]. Nejvýrazněji zvýšila afinitu k IR-A záměna na pozici B¹⁰ (E^{B10}-insulin), což dobře koreluje se studiemi, během kterých byla prokázána preference záporného náboje v této pozici, a to u IR-A i IGF-1R [108]. Záporný náboj v této pozici zvyšuje spolu s afinitou k IGF-1R i IR-A mitogenní působení analogu (měřeno na buněčné linii osteosarkomu Saos/B10) [109]. Zavedením 4 aminokyselin, které vykazovaly největší snížení afinity vůči IR-A vznikl analog, F^{A8}S^{A10}T^{B5}Q^{B16}-insulin, s afinitou k IR-A blízkou hodnotě IGF-I (viz Tab. 2, str. 30). Rozšířením substituce o aminokyseliny, které se nacházejí pouze u IGF-II (Thr^{A18} a Thr^{B14}) vznikl analog, F^{A8}S^{A10}T^{A18}T^{B5}T^{B14}Q^{B16}-insulin, jehož afinita byla blízká hodnotám IGF-II (viz Tab. 2, str. 30). Obdobným způsobem bylo testováno, zda povede náhrada aminokyselin IGF, které vedly ke snížení afinity k IR-A, aminokyselinami odvozenými z odpovídajících pozic insulinu ke zvýšení afinity k IR-A. A skutečně H⁴Y¹⁵T⁴⁹I⁵¹-IGF-I a H⁷A¹⁶Y¹⁸T⁴⁸I⁵⁰N⁵⁸-IGF-II vykazovaly vyšší afinity k IR-A (viz Tab. 2, str. 30) [106].

Na vysoké afinitě k IGF-1R se patrně výrazně podílí doména C faktoru IGF [110]. S tímto tvrzením je v souladu i výrazné zvýšení afinity k IGF-1R hybridní jednořetězcové molekuly insulinu s IGF-I, kde jsou řetězce A a B insulinu propojeny C-peptidem odvozeným z IGF-I stejně jako v molekule proinsulinu (C(IGF-I)^{A22-B-1}-insulin). Hybridní molekula vykazuje téměř nezměněnou afinitu k IR-A (113% afinity insulinu, testováno na BHK buňkách, transfekovaných lidským IR-A) a výrazně vyšší afinitu k IGF-1R oproti lidskému insulinu (28 % hodnoty IGF-I oproti 0,2 % lidského insulinu, testováno na buňkách BHK, transfekovaných lidským IGF-1R) [111]. Podobně vykazovala vysoké hodnoty afinit dvouřetězcová hybridní molekula insulinu a IGF-I, kdy bylo posledních 8 aminokyselin C-konce řetězce B insulinu nahrazeno 20 aminokyselinami odvozenými z IGF-I, zahrnujících C-konec domény B a domény C (GFYFNKPTGYGSSSKKAPQT^{B23-42}-insulin). Afinita analogu k IGF-1R byla 20 % hodnoty IGF-I a k IR 28 % hodnoty insulinu (testováno na placentárních membránách kompetitivní metodou s ¹²⁵I-insulinem/IGF-I) [112].

Obdobným způsobem, jako doména C IGF-I zvyšuje afinitu hormonů k IGF-1R, by mohla doména C IGF-II přispívat ke zvýšení afinity při vazbě na IR-A a jeho aktivace. S tímto předpokladem jsou v souladu i vlastnosti hybridních molekul IGF-I a II se vzájemně zaměněnými doménami C, IGF-ICII a IGF-IIICI. IGF-II dokáže aktivovat IR-A 2- až 4krát slaběji než insulin (v závislosti na stanovovaném substrátu), kdežto IGF-I pouze nepatrně zvýší hladinu aktivace nad bazální úroveň. Při záměně C-domén obou molekul se schopnost spouštět fosforylaci receptoru obrátila. Aktivace Erk-kinasy byla výrazně nižší ve srovnání s insulinem, a to v obou případech IGF-I i II. Překvapivě, navzdory nízké schopnosti spouštět fosforylaci Erk, dosahoval IGF-II stejného účinku jako insulin na migraci a životaschopnost (stanoveno hodnotou hladiny ATP) buněk zprostředkovanou prostřednictvím IR-A. IGF-I byl v tomto ohledu méně účinný, kdežto IGF-ICII vykazoval stejný účinek jako IGF-II [113]. V tabulce 2 jsou shrnuty vazebné afinity diskutovaných hybridních analogů.

Tab. 2: Vazebné afinity hybridních molekul insulinu a IGF k IR-A a IGF-1R

<i>Analog</i>	<i>IR-A</i>	<i>IGF-1R</i>
Insulin	100%	0,1 % [111]
IGF-II	4,8 % [106]	
IGF-I	0,6 % [106]	100%
Q ^{B16} -insulin	10 % [106]	
E ^{B10} -insulin	400 % [114]	
F ^{A8} S ^{A10} T ^{B5} Q ^{B16} -insulin	0,7 % [106]	
F ^{A8} S ^{A10} T ^{A18} T ^{B5} T ^{B14} Q ^{B16} -insulin	2,7 % [106]	
H ⁴ Y ¹⁵ T ⁴⁹ I ⁵¹ -IGF-I	24,4% [106]	
H ⁷ A ¹⁶ Y ¹⁸ T ⁴⁸ I ⁵⁰ N ⁵⁸ -IGF-II	12,7 % [106]	
C(IGF-I) ^{A22-B-1} -insulin	113 % [111]	28% [111]
GFYFNKPTGYGSSSKAPQT ^{B23-42} -insulin	28 ± 3 % [112]	20± 7% [112]

2. CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce byla příprava analogů insulinu, jejichž C-konec řetězce B je prodloužen o aminokyseliny odvozené z domény C lidského IGF-II, a stanovení jejich vazebné afinity k oběma isoformám insulinového receptoru a IGF-1R *in vitro*. Dalším cílem byla rekombinantní příprava analogu lidského IGF-II (Gly⁻¹IGF-II) v bakteriálním systému *E. coli* a stanovení jeho vazebných afinit k výše uvedeným typům receptorů *in vitro*. Příprava analogů insulinu a IGF-II byla navržena za účelem přispět k objasnění úlohy domény C faktoru IGF-II v selektivě vazebných interakcích s receptory IR-A, IR-B a IGF-1R. Příprava Gly⁻¹IGF-II byla provedena s cílem vytvoření platformy pro přípravy rekombinantních analogů IGF-II.

1. Příprava následujících analogů insulinu enzymovou semisyntézou:
 - a. S^{B31}-insulin
 - b. SR^{B31-32}-insulin
 - c. SKV^{B31-33}-insulin
 - d. SKVS^{B31-34}-insulin
2. Rekombinantní příprava Gly⁻¹IGF-II v bakteriálním systému *E. coli*
3. Stanovení vazebných afinit k IR-A, IR-B a IGF-1R *in vitro* u všech připravených analogů insulinu a Gly⁻¹IGF-II.

3. MATERIÁL

Buňky R⁻IR-B - myši embryonální fibroblasty s blokovanou expresí genů pro myši IGF-1R, transfekované lidským IR-B, darovány Prof. A. Belfiorem, Univerzita Catanzaro, Itálie

Buňky R⁺ - myši fibroblasty s blokovanou expresí genů pro myši IGF-1R, transfekované lidským IGF-1R, darovány Prof. A. Belfiorem, Univerzita Catanzaro, Itálie

Butan-1,2,- diol – Fluka, Buchs, Švýcarsko

Escherichia coli BL21(DE3) - kompetentní buňky *E. coli* s DE3 λ profágem, nesoucím gen T7-polymerasy pod transkripční kontrolou *lacUV5* promotoru – Novagen (Merck), Darmstadt, Německo

Plasmid obsahující gen pro Gly⁻¹IGF-II ve fúzi s His₆GB1s expresí řízenou T7 promotorem - poskytnut Dr. Fábrym, ÚOCHB AV ČR, Laboratoř strukturní biologie

diethylether – Penta, Chrudim, ČR

Hovězí sérový albumin (BSA) – Invitrogen, Carlsbad, Kalifornie, USA

2-Cl-tritylová pryskyřice – Novabiochem, Lucerne, Švýcarsko

IGF-I – Tercica, Kalifornie, USA

IGF-II – Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Mono-¹²⁵I^{A14}-lidský insulin – Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA

Mono – ¹²⁵I-IGF-I - Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA

Fmoc-chráněné aminokyseliny – Novabiochem, Lucerne, Švýcarsko

Fmoc-Phe-OH – AK Scientific, Inc., Union City, Kalifornie, USA

Fmoc-Thr(*t*Bu) – OH – Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Hydroxid sodný – Penta, Chrudim, ČR

Chlorid sodný – Penta, Chrudim, ČR

Kyselina chlorovodíková (HCl) – Penta, Chrudim, ČR

Kyselina octová 99% - Penta, Chrudim, ČR

Lidský insulin – Sigma, St. Luis, USA

Médium DMEM –Life Technologies Czech Republic s.r.o.

N,N- dimethylacetamid (DMA) – Fluka, Buchs, Švýcarsko

Trypsin – Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Vepřový insulin – Spofa a.s., Praha, ČR

Wangova pryskyřice –Val(*t*Bu)-OH - Wang resin, Novabiochem, Lucerne, Švýcarsko

Tris - SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo

Thioanizol – Fluka, Buchs, Švýcarsko

Trifluoroctová kyselina (TFA) – Fluka, Buchs, Švýcarsko

4-(2-hydroxyethyl)1-piperazinyethansulfonová kyselina (HEPES) – Sigma-Aldrich, St.
Louis, Missouri, USA

2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3 – tetramethyluronium hexafluorofosfát (HBTU) – Novabiochem,
Lucerne, Švýcarsko

Sephadex G10, Sephadex G50 – Pharmacia, Uppsala, Švédsko

LB-médium (složení: 10 mg/ml Bacto Trypton, 5 mg/ml kvasinkový extrakt, 5 mg/ml chlorid
sodný) -Voigt Global Distribution, Inc., Lawrence, USA

LB agar – Voigt Global Distribution, Inc., Lawrence, USA

Ostatní běžné používané chemikálie byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich, St. Louis,
Missouri, USA

4. METODY

4.1. Příprava peptidů

4.1.1. Příprava peptidů manuální syntézou na pevné fázi

Peptidy G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S, G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R a G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V-S byly připraveny metodou manuální syntézy na pevné fázi na acidolabilní 2-chlorotrityllové pryskyřici v množství 400 μmol . K přípravě byly použity aminokyseliny s chráněnými α -aminoskupinami bazickolabilní 9-fluorenylmethyloxycarbonylovou skupinou (Fmoc). Postranní řetězce threoninu, tyrosinu a serinu byly chráněny *terc*-butylovou skupinou (*t*Bu). ϵ -aminoskupiny lysinu byly chráněny enzymově odstranitelnou fenylacetylovou skupinou (Pac).

Kondenzace aminokyselin probíhala dle upraveného protokolu, již dříve popsaného Fieldsem a kol. [115]. První aminokyselina, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH/Fmoc-Arg(Pmc)-OH, byla připojena k pryskyřici následujícím postupem: 1 ekvivalent (400 μmol) aminokyseliny byl přidán k 1 ekvivalentu pryskyřice se 3 ekvivalenty *N,N*-diisopropylethylaminu (DIPEA) v 1,6 ml suchého dichlormethanu (DCM). Reakce probíhala po dobu 1,5 hod při laboratorní teplotě za stálého míchání. Po uplynutí doby reakce byla pryskyřice s navázanou aminokyselinou ponechána 3krát 3 min ve směsi DCM:methanol:DIPEA (17:2:1 v/v), aby se zablokovaly nezreagované chloridové skupiny pryskyřice. Poté byla reakční směs 5krát promyta 2 ml dimethylformamidu (DMF). Fmoc chránicí skupina byla následně odštěpena 1 ml 30% roztoku piperidinu v DMF (5 a 20 min). Účinnost navázání první aminokyseliny a odstranění chránicí skupiny byla stanovena spektrofotometricky. Piperidin-dibenzofulvenový komplex, vzniklý reakcí odštěpené chránicí skupiny Fmoc a piperidinu, absorbuje záření o vlnové délce 301 nm (s extinčním koeficientem 7040 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Množství odštěpené Fmoc skupiny odpovídá množství navázané aminokyseliny. Kondenzace dalších aminokyselin probíhala ve směsi kondenzačního činidla 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfátu (HBTU) a DIPEA v poměru 3 ekvivalenty Fmoc-chráněné aminokyseliny, 3 ekvivalenty HBTU a 5 ekvivalent DIPEA, vše rozpuštěno v 1-methyl-2-pyrrolidinonu (NMP) v celkovém objemu 1,5 ml. Kondenzační reakce probíhaly 1-2 hodiny a byly 2- až 3krát opakovány. Úplnost reakcí byla kontrolována Kaiserovým testem [116]. U peptidů G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S a G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V-S byla pryskyřice s výsledným peptidem převedena do reaktoru, důkladně promyta DMF, poté DCM a vysušena odsátím

za pomoci vodní vývěvy. Peptid byl z pryskyřice odštěpen směsí 60% (v/v) DCM, 20% (v/v) kyseliny octové, 20% (v/v) trifluoroethanolu (TFE) po dobu 2 hod. Směs byla odpařena dosucha na vakuové vodní odparce. Postranní chránicí skupiny byly odštěpeny směsí 44% (v/v) DCM, 50% (v/v) kyseliny trifluoroctové (TFA), 3% (v/v) triisopropylsilan (TIS), 3% H₂O. Získaný produkt byl znovu odpařen na odparce, extrahován diethyletherem a poté ponechán vysušit v exsikátoru přes noc. Vzniklé peptidy byly rozpuštěny v 40% acetonitrilu s 0,1% TFA a přečištěny pomocí RP-HPLC v gradientu 3 (viz Tab. 4, str. 39).

V případě peptidu Boc-G-F-F-Y(O-*t*Bu)-T(O-*t*Bu)-P-K(Pac)-T(O-*t*Bu)-S(O-*t*Bu)-R(Pmc) byla použita poslední aminokyselina s *terc*-butyloxykarbonylovou chránicí skupinou (Boc) (Boc-Gly-OH). Připravený peptid byl odštěpen z pryskyřice v plně chráněné formě působením 60% (v/v) DCM, 20% (v/v) kyseliny octové, 20% (v/v) trifluoroethanolu (TFE) po dobu 2 hod. Reakční směs byla odpařena do sucha na rotační vakuové odparce a promyta DCM.

4.1.2. Automatická syntéza peptidů na pevné fázi

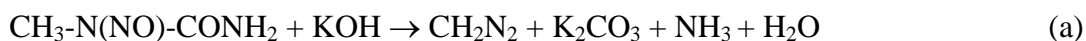
Peptid G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V byl syntetizován v servisním pracovišti Syntéza peptidů ÚOCHB AV ČR na automatizovaném syntetizátoru ABI 433A od společnosti Applied Biosystems. příprava byla provedena metodou dle Merrieffielda pro syntézu peptidů na pevné fázi [117] s aminokyselinami, jejichž α -aminoskupiny byly chráněny Fmoc skupinou. K ochraně postranních skupin byly použity *t*Bu. Peptid byl syntetizován na Wangově pryskyřici komerčně substituované terminální C-koncovou aminokyselinou (Val). Syntéza byla provedena v měřítku 260 μ mol. Pro každou kondenzaci byl použit desetinásobek potřebného množství α N-chráněné aminokyseliny se stejným molárním množstvím činidel HBTU/HOBt a nadbytkem DIPEA. Reakce probíhaly v prostředí NMP. Každý cyklus trval 30 min a byl 1- až 2krát opakován. Pryskyřice s připraveným peptidem byla promyta DCM a vysušena vodní vývěvou. Peptid byl odštěpen z pryskyřice při současném odštěpení chránicích skupin postranních řetězců směsí TFA:TIS:H₂O 95%:2,5%:2,5% (v/v) v celkovém objemu 5 ml. Reakce probíhala 2 hodiny. Poté byla směs odpařena dosucha a následně extrahována diethyletherem. Výsledný peptid byl přečištěn na RP-HPLC v gradientu 3 (viz Tab. 4, str. 39). Odštěpení peptidu z pryskyřice a odstranění chránicích skupin bylo provedeno podle dříve připraveného protokolu Anny Povalové, publikovaného v její bakalářské práci [118].

4.2. Konverze Boc-G-F-F-Y(O-*t*Bu)-T(O-*t*Bu)-P-K(Pac)-T(O-*t*Bu)-S(O-*t*Bu)-R(Pmc) na Boc-G-F-F-Y(O-*t*Bu)-T(O-*t*Bu)-P-K(Pac)-T(O-*t*Bu)-S(O-*t*Bu)-R(Pmc)-OCH₃

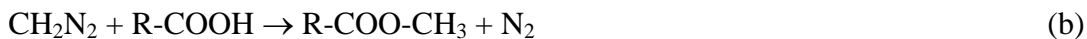
Peptid Boc-G-F-F-Y(O-*t*Bu)-T(O-*t*Bu)-P-K(Pac)-T(O-*t*Bu)-S(O-*t*Bu)-R(Pmc) byl převeden na C-koncový methylester působením diazomethanu na karboxylovou skupinu terminální aminokyseliny, aby byla snížena pravděpodobnost spojení dvou peptidů trypsinem při enzymové semisyntéze.

4.2.1. Provedení esterifikace

Diazomethan, CH₂N₂, byl připraven reakcí *N,N*-nitrosomethylmočoviny s hydroxidem draselným dle rovnice (a).



Roztok 1,5 g KOH ve 3 ml H₂O byl smíchán s 10 ml diethyletheru a udržován v ledové lázni při 0°C. Poté byl přidán 1 g *N,N*-nitrosomethylmočoviny a reakční směs byla zahřívána na 40–50 °C. Vznikající diazomethan byl za pomoci proudu argonu zaváděn do roztoku peptidu rozpuštěného v DCM. Terminální karboxylová skupina Arg(Pmc) v připraveném peptidu byla převedena na methylester dle rovnice (b).



Reakce byla zastavena při zežloutnutí roztoku peptidu, což indikovalo nadbytek CH₂N₂. Nespotřebovaný CH₂N₂ byl následně odstraněn několika kapkami 10% (v/v) kyseliny octové za vzniku methylesteru kyseliny octové. Reakční směs byla odpařena dosucha.

4.2.2. Odštěpení chránících skupin (Boc, *t*Bu, Pmc)

Při štěpení peptidu z pryskyřice byly zachovány všechny chránící skupiny (Boc, *t*Bu a Pmc). Tyto skupiny byly po esterifikaci peptidu odštěpeny směsí 96% (v/v) TFA, 0,8% (w/w) fenol, 0,8% (v/v) thioanisol 0,8% (v/v) H₂O 1,6% (v/v) TIS po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Směs byla následně 4krát odpařena s DCM. Produkt byl vysušen v exsikátoru, extrahován diethyletherem a poté opět vysušen. Získaný peptid byl rozpuštěn v 40% acetonitrilu a preparován na RP-HPLC v gradientu 3 (viz Tab. 4, str. 39).

4.3. Příprava desoktapeptid^{B23-30}-insulinu (DOI)

Desoktapeptid^{B23-30}-insulin (DOI) byl připraven metodou dříve popsanou Žákovou a kol. [119].

4.3.1. Odstranění iontů Zn^{2+} z vepřového insulinu

Nejprve byl z preparátu vepřového insulinu odstraněn zinek metodou dle Carpentera [120]. 1 g vepřového insulinu byl rozpuštěn v 70 ml 0,25 M HCl. Insulin byl ze směsi vysrážen 1 litrem vychlazeného acetonu na 4°C a ponechán přes noc v chladu. Sraženina byla odstředěna (20 min, 2000 × g, laboratorní teplota) a promyta vychlazeným acetonem. Vzniklá peleta byla rozpuštěna v 10% (v/v) kyselině octové a lyofilizována.

4.3.2. Štěpení koncového oktapeptidu vepřového insulinu

Vepřový insulin zbavený iontů Zn^{2+} byl rozpuštěn ve 200 ml 0,05 M Tris/HCl pufru a 0,1 M $CaCl_2$. Hodnota pH byla upravena na 9,1. Reakce byla iniciována přidáním TPCCK-trypsinu (E.C.3.4.21.4) v molárním poměru 1/20 (enzym/substrát) a probíhala při laboratorní teplotě po dobu 20 hodin za stálého míchání. Po uplynutí této doby bylo pH reakce sníženo na hodnotu 5,4 přidáním 1 M HCl. Desoktapeptid^{B23-30}-insulin se z roztoku vysrážel a sraženina byla odstředěna (20 min, 2000 × g, laboratorní teplota). Peleta byla rozpuštěna v 10% (v/v) kyselině octové a lyofilizována. Vzniklý produkt byl rozpuštěn v malém množství 10% (v/v) kyseliny octové a oddělen gelovou chromatografií na koloně Sephadex G50 při průtoku 1 ml/min. Průtoková rychlost byla udržována peristaltickou pumpou, Minipuls 2, Gilson. Frakce byly sbírány po 12 min za použití frakčního kolektoru společnosti Waters. Na základě absorpčního profilu při 276 nm byly určeny ty frakce, které obsahují DOI. Spojené frakce byly lyofilizovány. Lyofilizát byl rozpuštěn v malém množství 10% (v/v) kyseliny octové, analyzován a purifikován pomocí RP-HPLC v gradientu 3 (viz Tab. 4, str. 39).

4.4. Použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) k rozdělení peptidů

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie peptidů byla prováděna na přístrojích společnosti Waters (čerpadlo Waters 600, duální UV/VIS detektor Waters 2487). K rozdělení látek byly použity kolony vyplněné silikagelem s navázanými

oktadodecyllovými skupinami (C18) a butylovými skupinami (C4). Data byla zpracována chromatografickým programem Clarity Lite Data Apex, ČR.

4.4.1. Použití analytické RP-HPLC k analýzám roztoků látek a reakčních směsí

Analytická vysokoúčinná kapalinová chromatografie byla využívána k analýzám reakčních směsí během reakcí a ke stanovení čistoty jednotlivých reaktantů a výsledných molekul. Pro analytické provedení RP-HPLC byly použity kolony Nucleosil120-5 C18 o rozměrech 250 × 4 mm společnosti Macherey-Nagel, a 214TP54-C4 o rozměrech 250 × 4,6 mm společnosti Vydac. V obou případech byl průtok 1 ml/min. Eluce látek byla prováděna roztokem se stoupající koncentrací acetonitrilu s 0,1% TFA v deionizované vodě s 0,1% TFA. Látky byly detekovány na základě jejich absorpce záření o vlnových délkách 276 a 218 nm.

Tab. 3: Používané gradienty při analytické RP-HPLC

Gradient 1 : Gradient elučního roztoku používaný při analytické RP-HPLC na koloně Nucleosil 120-5 C18 Macherey-Nagel o rozměrech 250 × 4 mm, s průtokem 1 ml/min.

Čas [min]	0	1	21	34	37	37,1
Koncentrace acetonitrilu [%]	8	28	36	44	72	8

Gradient 2 : Gradient elučního roztoku používaný při analytické RP-HPLC na koloně 214TP54-C4 Vydac o rozměrech 25 × 4,6 mm, s průtokem 1 ml/min.

Čas [min]	0	30	31	32	33
koncentrace acetonitrilu [%]	20	40	80	80	20

4.4.2. Použití preparativní RP-HPLC pro izolaci peptidů

K preparaci peptidů po syntéze na pevné fázi byla použita preparativní kolona Nucleosil 105-5 C18 o rozměrech 250 x 21 mm společnosti Macherey-Nagel, s průtokem 9 ml/min. Pro preparaci produktů semisyntézy byla použita semi-preparativní kolona Nucleosil 100-7 C18 o rozměrech 250 × 8 mm společnosti Macherey-Nagel, s průtokem 3 ml/min. Pro preparaci rekombinantně připraveného analogu IGF-II byla použita semipreparativní kolona 214TP510-C4 o rozměrech 250 × 10 mm společnosti Vydac. Eluce látek byla prováděna stoupající koncentrací acetonitrilu s 0,1% TFA v deionizované vodě, obsahující 0,1% TFA (viz Tab. 4, str. 39). Detekce látek byla prováděna na základě absorpce záření při vlnových délkách 218 a 276 nm.

Tab. 4: Používané gradienty při preparativním provedení RP-HPLC

Gradient 3: Gradient elučního roztoku použitý při preparativní RP-HPLC na preparativní koloně Nucleosil 105-5 C18 Macherey Nagel, o rozměrech 250 × 21 mm s průtokem 9 ml/min.

Čas [min]	0	30	31
Koncentrace acetonitrilu [%]	8	80	8

Gradient 4: Gradient elučního roztoku, použitý při preparativní RP-HPLC na semipreparativní koloně Nucleosil 100-7 C18 Macherey-Nagel o rozměrech 250 × 8 mm, s průtokem 3 ml/min.

Čas [min]	0	1	21	35	36	37	37,1
Koncentrace acetonitrilu [%]	8	28	36	44	72	72	8

Gradient 5: Gradient elučního roztoku použitý při preparativní RP-HPLC na semipreparativní koloně 214TP510-C4 Vydac o rozměrech 250 × 10 mm, s průtokem 4 ml/min.

Čas [min]	0	33	35	36	37
Koncentrace acetonitrilu [%]	20	44	80	80	20

4.5. Hmotnostní spektrometrie meziproduktů a výsledných analogů insulinu/ IGF-II

Hmotnostní spektra látek byla měřena v Laboratoři hmotnostní spektrometrie ÚOCHB AV ČR za použití přístroje LTQ Orbitrap XL společnosti Thermo Fisher Scientific použitím metody ESI (z anglického označení „*Electrospray ionization*“) v pozitivním módu.

4.6. Enzymová semisyntéza analogů insulinu

Pro přípravu analogu insulinu S^{B31}-insulinu byla použita upravená metoda enzymové semisyntézy dříve popsaná Svobodou a kol. [121] a Žákovou a kol. [119]. Pro analogy insulinu, vycházející z více hydrofóbních peptidů, SKV^{B31-33}-insulin, SR^{B31-32}-insulin, SKVS^{B31-34}-insulin, byla použita metoda dle Nakagawy a Tagera [122], poskytující lepší rozpustnost peptidů. Výchozím materiálem byl v případě obou metod DOI (viz kapitola 4.3) a synteticky připravený peptid (viz kapitoly 4.1, 4.2). Reakce probíhala při pH 6,9-7,1 za přítomnosti trypsinu, který je v těchto podmínkách schopen tvořit peptidovou vazbu mezi karboxylovou skupinou Arg^{B22} desoktapeptid^{B23-30}-insulinu a N-terminální aminokyselinou příslušného peptidu.

4.6.1. Semisyntéza K(Pac)^{B29}S^{B31}-insulinu

30 μmol peptidu, G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S, a 6 μmol DOI bylo rozpuštěno v celkovém objemu 200 μl roztoku 55% (v/v) DMF a 20 mM octanu vápenatého. Reakce byla započata přidáním TPCK-trypsinu v molárním poměru 1/30 (enzym/DOI) a úpravou

pH na 6,9-7,1 pomocí *N*-methylmorpholinu. Výsledná reakční směs byla inkubována při laboratorní teplotě za neustálého míchání. Průběh reakce byl sledován analytickou RP-HPLC (viz Tab. 3, str. 38). Po ukončení reakce byl k reakční směsi přidán 1,5 ml acetonu. Vzniklá sraženina byla odstředěna (10 min, 13 000 × g, laboratorní teplota) a supernatant oddělen. Peleta byla vysušena od zbývajících acetonu a následně rozpuštěna v 10% (v/v) kyselině octové. Produkt byl izolován preparativní RP-HPLC v gradientu 4 (viz Tab. 4, str. 39).

4.6.2. Semisyntéza K(Pac)^{B29}SR^{B31-32}-, K(Pac)^{B29}SK(Pac)V^{B31-33}- a K(Pac)^{B29}SK(Pac)VS^{B31-34}-insulinu

30 mM peptid byl spolu s 7,7 mM desoktapeptid^{B23-30}-insulinem rozpuštěn v celkovém objemu 400 µl směsi *N,N*-dimethylacetamid (DMA):butan-1,4-diol:0,2 M Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM Ca(Ac)₂ a 1 mM EDTA v poměru 35 % : 35 % : 30 %. Reakce byla započata přidáním 2,0 mg TPCCK-trypsinu a úpravou pH na hodnotu 6,9-7,1 přidáním *N*-methylmorpholinu. Reakční směs byla inkubována za stálého míchání při laboratorní teplotě a její průběh byl sledován analytickou RP-HPLC v gradientu 1 (viz Tab. 3, str. 38). Po ukončení reakce bylo ke směsi přidáno 1,5 ml acetonu, sraženina byla odstředěna (10 min, 13 000 × g, laboratorní teplota), vysušena a resuspendována v 10% kyselině octové. Při zpracování produktů reakce bylo postupováno stejně jako v předešlém případě. Analog K(Pac)^{B29}SK(Pac)V^{B31-33}-insulin byl připraven přesně podle dříve vytvořeného protokolu Anny Povalové, publikovaného v její bakalářské práci [118].

4.6.3. Odstranění fenylacetylové chránicí skupiny postranního řetězce Lys

Fenylacetylová skupina byla použita k chránění ε-aminoskupiny lysinu. Chránění aminoskupiny lysinu je nezbytné při syntéze peptidů na pevné fázi, ale i při následné enzymové semisyntéze, aby nedošlo k nežádoucímu připojení karboxylu argininu k ε-aminoskupině lysinu nebo k rozštěpení peptidu trypsinem. Chránicí skupina Pac byla odstraněna z příslušných lysinů insulinových analogů působením enzymu penicilinamidohydrolasy (E. C. 3. 5. 1. 11) metodou dle Žákové a kol. [119].

Insulinové analogy byly rozpuštěny v 1 ml 50 mM K-fosfátového pufru (pH 7,5) v přibližném množství 1 mg na 250 µl u K(Pac)^{B29}S^{B31}-insulinu a 1 mg na 900 µl u ostatních analogů. K reakční směsi byl přidán roztok inhibitorů proteas v množství 2 µl na 1 ml roztoku. Roztok (Protease Inhibitor Cocktail, P8340 Sigma) je složen z inhibitorů

AEBSF (104 mM), aprotinin (80 μ M), bestatin (4 μ M), E-64 (1,4 mM), leupeptin (2 mM) a pustatin A (1,5 mM). Reakce byla spuštěna přidáním penicilinamidohydrolasy (10 U v 10 μ l 50 mM K-fosfátového pufru). Reakce probíhala za stálého míchání při 37°C po dobu 6 až 50 hodin. Průběh reakce byl sledován analytickou RP-HPLC v gradientu 1 (viz Tab. 3, str. 38). Po skončení reakce byl výsledný analog přečištěn na preparativní RP-HPLC v gradientu 4 (viz Tab. 4, str. 39). Přítomnost analogu byla potvrzena hmotnostní spektrometrií a jeho čistota ověřena analytickou RP-HPLC v gradientu 1 (viz Tab. 3, str. 38).

4.7. Rekombinantní příprava Gly⁻¹IGF-II

K přípravě Gly⁻¹IGF-II byla použita metoda rekombinantní přípravy proteinů v expresním systému bakterií *Escherichia coli*. Metoda byla zvolena díky své relativní jednoduchosti a možnosti dosažení většího výtěžku ve srovnání s přípravou proteinu totální chemickou syntézou. Příprava proteinu probíhala ve spolupráci s Rozálií Hexnerovou dle společného protokolu publikovaném v této a její diplomové práci [123].

4.7.1. Transformace bakterií

K expresi proteinu Gly⁻¹IGF-II byly použity kompetentní buňky *E. coli* kmene BL21(DE3) nesoucí gen T7-polymerasy pod transkripční kontrolou *lacUV5* promotoru, zakoupené od společnosti Novagen a uchovávané v odděleném mrazicím boxu při teplotě -80°C. Indukcí exprese T7-polymerasy (přidáním ethylglukoronidu) dojde následně k rapidnímu zvýšení exprese proteinu pod T7 promotorem.

Buňky byly transformované plasmidem, připraveným v oddělení Strukturní biologie ÚOCHB AV, ČR. Plasmid kóduje sekvenci aminokyselin požadovaného proteinu (Gly⁻¹IGF-II) ve fúzi s proteinem His₆GB1, upravenou pro expresi v bakteriích. Přítomnost fúzního proteinu usnadnila následující detekci a izolaci His₆GB1-Gly⁻¹IGF-II. Exprese genu byla řízena T7-promotorem. Dále byla v plasmidu obsažena informace o rezistenci ke kanamycinu, což umožnilo snadné rozlišení úspěšně transformovaných buněk.

100 μ l kompetentních buněk BL21(DE3) o OD₅₅₀ přibližně 0,2 bylo transformováno 1 μ l roztoku, obsahujícím 50-100 ng plasmidu, metodou tepelného šoku. Buňky byly drženy 45 min na ledu, na 90 sekund ponořeny do teplé lázně (42°C) a na 2 min vráceny zpět na led. Nakonec byly buňky inkubovány po dobu 60 min v 900 μ l LB média při 37°C v inkubátoru (TCH 100, Laboratorní přístroje Praha, ČR).

4.7.2. Kultivace bakterií

Z inokula transformovaných buněk (900 μ l) bylo 300 μ l zaočkováno na agarovou plotnu o průměru 20 cm (150 ml LB agar, 1% (w/v) glukosa, kanamycin (30 mg/l)) a inkubováno přes noc při 37°C. Kultivace na agarové plotně umožnila růst pouze úspěšně transformovaných bakterií, a to díky přítomnosti selekčního markeru (kanamycinu).

Následující den byly buňky smyty z plotny 10 ml LB média s kanamycinem (30 mg/l) a byla změřena jejich optická hustota při 550 nm (OD_{550}). Takto vytvořené inokulum bylo zaočkováno do 0,5 l růstového média (LB médium, 0,4% (v/v) glycerol, kanamycin (30 mg/l)) tak, aby výsledné OD_{550} bylo přibližně 0,1. Media s bakteriální kulturou byly inkubovány při 37°C v rotačním inkubátoru (Gallenkamp, Velká Británie) za točení rychlostí 200 ot./min. Každou hodinu byl kontrolován jejich růst měřením OD_{550} . Když hodnota OD_{550} překročila 1,0, byla indukována exprese proteinu přidáním ethylglukoronidu do růstového média, tak aby jeho výsledná koncentrace byla 1 mM. Při poklesu hodnoty OD_{550} byla kultivace zastavena (3-5 hod). Biomasa byla odstředěna (20 min, 4000 \times g, 4°C) a uchována při -20°C pro další zpracování.

4.7.3. Desintegrace bakteriálních buněk a izolace inkluzních tělísek

Tvorba inkluzí uvnitř buněk byla potvrzena na optickém fázově kontrastním mikroskopu (Carl Zeiss, Jena, Německo) ze vzorku kultivačního média, odebraného těsně před indukcí exprese proteinu (před přidáním ethylglukoronidu). Inkluzní tělíska byla ze získané biomasy izolována díky své velké hustotě oproti zbylým buněčným frakcím následujícím způsobem: Získaná biomasa (x g) byla resuspendována v 10 \times x ml pufru se složením 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA a 50 μ M fenylmetansulfonylfluorid. Roztok byl homogenizován za použití emulsiflexu (EmulsiFlex-C3, Avestin, Kanada) a odstředěn na centrifuze (20 min při 20 000 \times g, 4°C). Supernatant byl uchován (označen jako CS) a peleta resuspendována v 10 \times x ml pufru se složením 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA a 0,1% triton. Vzniklá suspenze byla sonikována na ledu na sonikátoru Sonic Dismembrator (Dynatech, USA) při 60% výkonu po dobu 1-2 min a odstředěna (20 min, 20 000 \times g, 4°C). Supernatant byl oddělen (W1) a peleta resuspendována v původním objemu. Sonikace byla 2krát opakována. Obsah všech získaných frakcí byl analyzován na elektroforéze za podmínek uvedených v kapitole 4.8.

4.7.4. Izolace His₆GB1-Gly⁻¹IGF-II z inkluzních tělísek za využití afinitní chromatografie

His₆GB1-Gly⁻¹IGF-II byl izolován z inkluzních tělísek za denaturujících podmínek a přítomnosti β -merkптоethanolu, což umožnilo separaci vysrážených proteinů a současně redukci náhodně vzniklých disulfidických můstků. Denaturace probíhala následujícím způsobem: Inkluzní tělíska získaná metodou popsanou v kapitole 4.7.3. byla resuspendována v minimálním množství pufru o složení (50 mM Tris, 300 mM NaCl) s takovým množstvím 10% (v/v) β -merkптоethanolu, aby jeho výsledná koncentrace po zředění do konečného objemu byla 0,02% (v/v). Vzniklá suspenze byla sonikována na ledu (Sonic Dismembrator, Dynatech, USA) při 60% výkonu po dobu 1-2 min a pomalu přikapávána do příslušného objemu roztoku 8 M močoviny v 50 mM Tris, 300 mM NaCl s hodnotou pH 8, přičemž x g inkluzních tělísek bylo rozpuštěno v celkovém objemu 40 × x ml roztoku. Směs byla ponechána denaturovat 3 hod při laboratorní teplotě za šetrného míchání a přístupu vzduchu, kdy vzdušný kyslík podpořil vznik disulfidických můstků uvnitř molekul His₆GB1-Gly⁻¹IGF-II.

His₆GB1 obsahoval sekvenci šesti histidinů, jejichž imidazolové skupiny se koordinují na ionty Ni²⁺. Díky tomu mohl být His₆GB1-Gly⁻¹IGF-II ze směsi oddělen afinitní chromatografií na koloně HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich, USA). Kontinuální přechod z denaturujících (50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8, 8 M močovina) do renaturujících podmínek (50 mM Tris, 300 mM NaCl) podpořil samovolný přechod navázaného proteinu na koloně do nativní konformace během afinitní chromatografie. Navázaný protein byl vytěsněn z kolony rostoucí koncentrací imidazolu (5 mM-0,5 M) v elučním roztoku. Eluované látky byly ručně jímány do frakcí. Přítomnost izolovaného proteinu ve frakcích byla ověřena analytickým provedením elektroforézy, jak je popsáno v kapitole 4.8. Průběh afinitní chromatografie je znázorněn v Tab. 5 na následující straně.

Tab. 5: Znáznornění průběhu afinitní chromatografie při použití kolony s chelatovanými ionty Ni^{2+} na 6% agarosovém gelu (HIS-Select Nickel Affinity Gel). Kolona byla před použitím uvedena do prostředí 50 mM Tris, 300 mM NaCl.

<i>Složení elučního roztoku</i>	<i>Označení jímáné frakce</i>	<i>Objem elučního roztoku při použití kolony o objemu V ml</i>
inkluze resuspendované v 8M močovina, 50mM Tris, 300mM NaCl, pH 8,0	FT	2V
8M močovina, 50mM Tris, 300mM NaCl, pH 8,0	W ₁	5V
50mM Tris, 300mM NaCl, pH 8,0	W ₂	10V
5mM imidazol, 50mM Tris, 300mM NaCl	W ₃	6V
50mM imidazol, 50mM Tris, 300mM NaCl	Frakce (po 5 ml)	5V
200 mM imidazol, 50mM Tris, 300mM NaCl	Frakce (po 5 ml)	5V
0,5M imidazol, 50mM Tris, 300mM NaCl	Frakce (po 5 ml)	5V
0,5M imidazol, 50mM Tris, 300mM NaCl	Frakce (5V ml)	5V

4.7.5. Dialýza směsi získané z afinitní chromatografie

K odstranění imidazolu po afinitní chromatografii byla použita dialýza. Dialýza byla prováděna v dialyzačních celulosových trubicích, jejichž propustnost byla volena minimálně 2krát menší, než byla velikost izolovaného proteinu. Roztok byl dialyzován proti 50násobnému přebytku dialyzačního roztoku během dvou až tří opakování. Dialýza probíhala při 4 °C o celkovém čase přibližně 30 hodin.

4.7.6. Enzymové odštěpení fúzního proteinu, His₆GB1

Po izolaci His₆GB1-Gly⁻¹IGF-II a odstranění imidazolu byl odštěpen fúzní protein, His₆GB1, který na svém C-konci obsahuje vazebné místo pro TEV-proteasu (E.C.3.4.22.44), sekvenci Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln/-Gly (ke štěpení dochází za Gln). TEV-proteasa byla použita díky své vysoké specifitě k rozpoznávané sekvenci, která se současně velmi zřídka vyskytuje v nativních proteinech. Štěpení fúzního proteinu probíhalo v prostředí 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 1,5 mM redukovaný glutathion a 0,15 mM oxidovaný glutathion v předpokládaném molárním poměru enzym/substrát 1/50. Reakce probíhala přes noc při laboratorní teplotě.

4.7.7. Izolace Gly⁻¹IGF-II

K oddělení Gly⁻¹IGF-II od reakční směsi po odštěpení fúzního proteinu byla použita afinitní chromatografie za použití kolony HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich, USA) při podmínkách popsaných v Tab. 6. Protein His₆GB1 díky polyhistidylové kotvě zůstal navázaný na koloně spolu s TEV-proteasou, která rovněž obsahovala polyhistidylovou kotvu. Gly⁻¹IGF-II protekl kolonou bez navázání a dle očekávání měl být přítomen ve frakcích FT a W. Přítomnost ve frakcích byla ověřena provedením elektroforézy za podmínek uvedených v kapitole 4.8.

Tab. 5: Znázornění průběhu afinitní chromatografie s použitím afinitní kolony s chelátovanými ionty Ni²⁺ na 6% agarosový gel (HIS-Select Nickel Affinity Gel). Kolona byla před použitím uvedena do prostředí 50 mM Tris, 300 mM NaCl.

<i>Složení elučního roztoku</i>	<i>Označení jímáné frakce</i>	<i>Objem elučního roztoku při použití afinitní kolony o objemu V [ml]</i>
reakční směs po štěpení	FT	10 × V
50mM Tris, 300mM NaCl	W	10 × V
0,5M imidazol, 50mM Tris, 300mM NaCl,	E ₁	5 × V
0,5M imidazol, 50mM Tris, 300mM NaCl,	E ₂	5 × V

4.7.8. Purifikace Gly⁻¹IGF-II

K odstranění vysokých koncentrací solí (50 mM Tris, 300 mM NaCl) byla použita mikrokolona CHROMABOND (Macherey-Nagel, Düren, Německo) naplněna silikagelem s navázanými butylovými skupinami (mikrokolona C4) a celkovým množstvím 0,5 g pevné fáze. Po nanesení vzorku na kolonu protekla polární rozpouštědla a proteinová frakce se navázala na kolonu díky nespecifickým hydrofobním interakcím. Navázaný vzorek byl z kolony vytěsněn 80% acetonitrem v 0,1% TFA. Přítomnost izolovaného proteinu v nepolární frakci byla potvrzena analytickou RP-HPLC v gradientu 2 (viz Tab. 2, str. 38). Vzorek byl lyofilizován, rozpuštěn v malém objemu roztoku 6,7% (v/v) kyseliny octové, 27% (v/v) acetonitrilu a 0,03% (v/v) TFA a přečištěn preparativní RP-HPLC v gradientu 5 (viz Tab. 4, str. 39).

4.8. Elektroforéza izolovaných směsí

K analytickému ověření přítomnosti izolovaného proteinu v dané směsi byla využívána elektroforetická separace látek. Separační metoda rozdělila látky podle rozdílné

rychlosti pohybu částic ve stejnosměrném elektrickém poli na základě jejich velikosti a náboji. Při analýze proteinů byl použit detergent, dodecylsírán sodný, SDS, kvůli své schopnosti vázat se na bílkoviny a vyrovnávat jejich přirozené nábojové rozdíly. Výhoda použití SDS je, že ho všechny bílkoviny vážou přibližně ve stejném poměru a to 1,4 g SDS na 1 g bílkovin. Výsledné komplexy SDS-bílkovina mají tedy podobnou hodnotu povrchového náboje a elektrickým polem migrují na základě délky polypeptidového řetězce, reprezentované M_r [124].

Při použití SDS-elektroforézy byly proteiny během migrace separovány na principu molekulového síta v polyakrylamidovém gelu. Dle velikosti stanovovaného proteinu byly použity různé koncentrace gelu. Proteiny s velkou molekulovou hmotností byly oddělovány při nízkých koncentracích polyakrylamidu a proteiny s malou molekulovou hmotností při vyšších koncentracích [125].

4.8.1. Příprava vzorků pro elektroforézu

Vzorky odebrané z analyzovaných směsí byly ředěny v poměru 2:1 vzorkovým pufrům (125 mM Tris pH 6,8, 20% (v/v) glycerol, 8,7% (v/v) β -merkaptoethanol, 4 % (w/w) SDS, 0,2 % brom-fenolová modř). Vzorky sedimentu byly rozpuštěny ve 30 μ l vzorkového pufru. Vzorky obsahujících vysoké koncentrace močoviny (8 M) byly ředěny v poměru 1:1 vzorkovým pufrům.

Při zpracování vzorků odebraných z kultivace bylo postupováno následujícím způsobem: 0,5 ml odebraného materiálu bylo odstředěno ($13\,000 \times g$, 5 min, laboratorní teplota). Buněčná peleta vzorku před indukcí byla rozpuštěna ve vzorkovém pufru a krátce sonikována na ledu. Peleta vzorku z konce kultivace byla resuspendována v 0,5 ml fosfátovém pufru (PBS) krátce sonikována na ledu a opět odstředěna za stejných podmínek. Následně byl vzorek připraven z takto získaného supernatantu i sedimentu výše uvedeným postupem.

Před nanesením na gel byl každý vzorek denaturován varem (1-2 min ve 100°C), což usnadnilo navázání SDS na molekuly proteinu.

4.8.2. Provedení elektroforézy

Elektroforetické dělení probíhalo za použití přístroje Mighty Small, (Hoefer Scientific, Kalifornie, USA) v prostředí 20 mM Tris o pH 8,3 200 mM glycin 0,1% (w/v)

SDS. Metodou upravenou dle klasického protokolu [126]. Složení jednotlivých gelů je znázorněno v Tab. 7.

Tab. 7: Složení gelů použitých při elektroforéze v systému glycin-Tris pufrů

<i>Typ gelu</i>	<i>Koncentrace akrylamidu</i>	<i>složení gelu</i>
Zaostřovací gel:	5% akrylamid (w/w) 0,14% bis-akrylamid (w/w)	1 mM EDTA 0,125M Tris/HCl pH 6,8 5% (v/v) glycerol 0,1% (w/w)SDS
15% separační gel	15% akrylamid (w/w) 0,41 % bis-akrylamid (w/w)	1,3 mM EDTA 0,375M Tris/HCl pH 8,8 0,1% (v/v)TEMED 0,1% (w/w)APS

Pro analýzu proteinů s nízkou molekulovou hmotností byl alternativně použit systém Tris-tricinových pufrů. Metoda byla upravena dle protokolu [127]. Elektroforéza probíhala v prostředí katodového a anodového pufru. Jako katodový pufr byl použit 0,1 M Tris, 0,1 M tricin, 0,1% (w/w) SDS o hodnotě pH 8,25. Anodový pufr byl roztok 0,21 M Tris, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 8,9. Složení použitých gelů je znázorněno v tabulce 8.

Tab. 8: Složený gelů použitých při elektroforéze v Tris-tricinovém systému pufrů

<i>Typ gelu</i>	<i>Koncentrace akrylamidu</i>	<i>složení gelu</i>
Zaostřovací gel	4 % akrylamid (akrylamid/bis-akrylamid 29/1)	0,75 M TrisHCl pH 8,45 0,075% (w/w) SDS, 65% (v/v) H ₂ O 0,08% (w/w) APS, 0,008% (v/v) TEMED
Separační gel	13,3 % akrylamid (akrylamid/bis-akrylamid 29/1)	1M Tris/HCl pH 8,45 0,03% (w/w) SDS, 9,3% (v/v) glycerol, 14,6 (v/v) % H ₂ O, 0,04% (w/w) APS, 0,004% (v/v) TEMED

Nejprve bylo nastaveno počáteční napětí 95 V po dobu 20 min pro zaostření vzorků, následně bylo napětí zvýšeno na 175 V. Elektroforetické dělení probíhalo přibližně po dobu 80 min. K určení molekulární hmotnosti analyzovaných proteinů byla použita komerční standardní směs proteinů o definované molekulové hmotnosti (SDS-page molecular standards, broad range, Biorad, Kalifornie, USA).

4.8.3. Vizualizace vzorků po elektroforéze

Po dokončení elektroforetického dělení byly proteiny vizualizovány metodou barvením stříbrem dle Merrila [128], kdy dochází k redukci Ag⁺ na Ag⁰.

Gely po elektroforéze byly po dobu 45 min fixovány v roztoku 50% (v/v) methanolu, 12% (v/v) kyseliny octové a 0,05% (v/v) formaldehydu. Po dokončení fixace byly gely ponechány v 50% (v/v) methanolu (3krát 5 min) a následně vloženy na 20 s do roztoku 1,3 mM Na₂S₂O₃. 3krát opláchnuty destilovanou vodou a na 20 min ponořeny do roztoku 11,8 mM AgNO₃, poté opět 3krát opláchnuty destilovanou vodou a vloženy do barvicího roztoku (57 mM Na₂CO₃, 0,05% (v/v) formaldehyd 0,026 mM Na₂S₂O₃). Barvení bylo zastaveno vložením gelu do roztoku 50% (v/v) methanolu a 12% (v/v) kyseliny octové (10 min). Nakonec byly gely opláchnuty 50% (v/v) methanolem a vysušeny.

4.9. Vazebné testy analogů insulinu a IGF-II s IR a IGF-1R *in vitro*

U připravených analogů insulinu a IGF-II byla testována afinita k oběma isoformám insulinového receptoru IR-A i IR-B a k IGF-1R. K vazebným testům vůči isoformě A byla použita buněčná linie lidských lymfocytů IM-9 s vysokou mírou exprese IR-A. K testování vazebné afinity vůči isoformě B a vůči IGF-1R byly použity myši embryonální fibroblasty s deletovaným genem pro IGF-1R. Buňky byly transfekované lidským genem pro expresi IR-B (označované jako R⁻ IR-B buňky) případně lidským genem pro expresi IGF-1R (označované jako R⁺ buňky).

4.9.1. Příprava analogů insulinu a IGF-II pro vazebné testování

Zásobní roztoky insulinu a jednotlivých analogů byly připraveny v 0,1% (v/v) kyselině octové v koncentraci 100 µg/ml. Koncentrace byly stanoveny spektrofotometricky měřením absorpance při vlnové délce 280 nm a s použitím extinkčních koeficientů ($\epsilon_{280} = 5840 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pro insulin a připravené analogy, $4560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pro IGF-II a Gly⁻¹IGF-II). Ředěním vazebným pufrům bylo těsně před samotným testováním dosaženo roztoků o klesající koncentraci v řádech 10⁻⁵ až 10⁻¹¹M.

4.9.2. Příprava buněk pro stanovení vazebné afinity k IR-A

Buněčná linie lidských lymfocytů IM-9 byla pěstována dle pokynů dodavatele ATCC (Manassas, USA; LGC Standards, Poland). Buňky byly pěstovány v inkubátoru při teplotě 37°C ve zvlhčené atmosféře s 5% (v/v) obsahem CO₂ v mediu RPMI-1640 (10% (w/w) fetální hovězí sérum, 100 U/ml penicilinu či streptomycinu a 2 mM Gln). Pro zajištění optimálních podmínek růstu byly buňky třikrát týdně „pasážovány“. Používané

chemikálie byly zakoupené od společnosti Invitrogen (Carlsbad, Kalifornie, USA). V den testování byly vypěstované buňky spočítány v Bürkerově komůrce a zředěny na koncentraci 2 milióny buněk/ml.

4.9.3. Stanovení vazebné afinity analogů insulinu a IGF-II k IR-A

Testování vazebné afinity probíhá jako kompetice mezi testovaným analogem a radioaktivně značeným lidským insulinem ^{125}I na Tyr^{A14} o vazebné místo na insulinovém receptoru námi upravenou metodou dle De Meytse [129]. Během testování je ve všech vzorcích zachováno konstantní množství buněk a radioaktivně značeného insulinu a postupně se zvyšuje koncentrace testované látky.

Reakce probíhala ve vazebném pufru (100 mM kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyethansulfonová (HEPES), 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM MgSO₄, 1mM EDTA, 10 mM glukosa, 15 mM octan sodný a 1% hovězí sérový albumin (BSA), pH 7,6). V každém vzorku bylo 400 μl buněk o koncentraci 2 milióny/ml, ^{125}I -insulin s aktivitou 20 000 impulsů/min a testovaný analog, přičemž celkový reakční objem byl 500 μl . Reakce byla inkubována po dobu 2,5 hod při 15°C. Každých 30 min byly všechny vzorky promíchány.

Po skončení reakční doby byla z každého vzorku vytvořena dvojice vzorků o objemu 200 μl . Následně bylo ke každému z vytvořených vzorků přidáno 200 μl vychlazeného vazebného pufru, čímž byla reakce zastavena. Vzorky byly odstředěny (10 min, 15 000 \times g, 4°C), poté byl odsát supernatant a měřena radioaktivita pelety pomocí γ -počítače (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, perkin Elmer, Wellesley, USA). Každá zkumavka byla měřena po dobu 10 min.

Získaná data byla analyzována za použití modelu vazby do jednoho vazebného místa (z anglického označení „one site fitting model“) metodou nelineární regrese za současného zohlednění deplece ligandu v programu GraphPad Prism 5.0. Během testování byla použita 0,01 nM koncentrace ^{125}I -insulinu. Pro disociační konstantu (K_d) ^{125}I -insulinu byla použita hodnota 0,3 nM.

4.9.4. Příprava buněk pro stanovení vazebné afinity k IR-B a IGF-1R

Buněčné linie myších embryonálních fibroblastů s deletovaným genem pro myšší IGF-1R a s vysokou mírou exprese IR-B (R^{IRB}) případně IGF-1R (R⁺) byly poskytnuty Dr. A Belfiorem a pěstovány dle jeho pokynů následujícím způsobem: Buňky byly

pěstovány v inkubátoru při teplotě 37°C ve zvlhčené atmosféře s 5% (v/v) obsahem CO₂ v médiu s vysokým obsahem glukosy (87,6% (v/v) DMEM medium s obsahem glukosy 4,5 g/l, 10% (w/w) fetální hovězí sérum (FBS), 2 mM L-Gln, 100 U/ml penicilin, 100 µg/ml streptomycin, 3 µg/ml puromycin) a třikrát týdně „pasážovány“. 2 případně 3 dny před testováním byly buňky nasazeny do 24-jamkových destiček v koncentraci 3000 respektive 1500 buněk na jamku.

4.9.5. Stanovení vazebné afinity analogů insulinu a IGF-II k IR-B a IGF-1R

Testování vazebné afinity probíhá stejně jako v prvním případě kompeticí mezi testovaným analogem a radioaktivně značeným lidským ¹²⁵I-insulinem (na Tyr^{A14}) případně lidským ¹²⁵I-IGF-I metodou dle Belfioreho [26]. Během testování je ve všech vzorcích zachováno konstantní množství radioaktivně značeného ¹²⁵I-insulinu/¹²⁵I-IGF-I (¹²⁵I-insulin: 43 000 impulsů/min pro stanovení vazebné afinity k IR-B, ¹²⁵I-IGF-I: 44 000 impulsů/min pro stanovení vazebné afinity k IGF-1R) a postupně se zvyšuje koncentrace testované látky. Počet buněk v jednotlivých vzorcích se pohyboval v rozmezí 24-26 000 u buněčné linie R^{IRB} a 14-16 000 u buněčné linie R⁺.

Buňky byly 2krát omyty vazebným pufrém (100 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, 10 mM glukosa 15 mM octan sodný a 1% (w/w) BSA, pH 7,6) a do každé jamky byla pipetována reakční směs v pořadí: vazebný pufr, odpovídající koncentrace testovaného analogu a ¹²⁵I-insulin/¹²⁵I-IGF-I s aktivitou 43 000 /44 000 impulsů/min. Celkový reakční objem byl 250 µl. Reakce byla inkubována při 5°C za stálého třepání po dobu 3 hod v případě stanovení afinity k IR-B u insulinu, analogů S^{B31}-insulin a SKV^{B31-33}-insulin, IGF-II a Gly¹-IGF-II. Během testování byly reakční podmínky optimalizovány a doba inkubace byla prodloužena z 3 na 16 hod. Reakce při stanovení vazebné afinity k IR-B u insulinu a analogů SR^{B31-32}- a SKVS^{B31-34}-insulinu byla inkubována 16 hod při 5 °C za stálého třepání. Při stanovení vazebné afinity k IGF-1R byla reakce inkubována 16 hod při 5°C za stálého třepání v případě všech testovaných analogů. Po ukončení inkubační doby byla reakční směs odsáta, buňky s navázanými analogy promyty vazebným pufrém a solubilizovány 0,1 M NaOH. Roztok se solubilizovanými buňkami byl přenesen do zkumavek a byla změřena jeho radioaktivita pomocí γ-počítače (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, USA). Každý vzorek byl měřen po dobu 60 s.

Získaná data byla analyzována za použití modelu vazby do jednoho vazebného místa (z anglického označení „*one site fitting model*“) metodou nelineární regrese za současného zohlednění deplece ligandu v programu GraphPad Prism 5.0. Během testování byla použita 0,043 nM koncentrace ^{125}I -insulinu a přibližně koncentrace 0,039 nM ^{125}I -IGF-I. Pro disociační konstantu ^{125}I -insulinu vůči IR-B byla použita hodnota 0,3 nM a pro K_d ^{125}I -IGF-I vůči IGF-1R hodnota 0,2 nM.

5. VÝSLEDKY

5.1. Syntéza peptidů na pevné fázi

5.1.1. Manuální syntéza peptidů

Peptidy G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S a G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V-S byly připraveny metodou popsanou v kapitole 4.1.1. Surové peptidy byly z pryskyřice odštěpeny působením 20% (v/v) kyseliny octové a chránicí skupiny (s výjimkou Pac) byly následně odstraněny pomocí 50 % (v/v) TFA.

5.1.2. Příprava peptidů na automatickém syntetizátoru

Peptid G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V byl připraven ve skupině Syntézy peptidů ÚOCHB AV ČR na automatickém syntetizátoru metodou popsanou v kapitole 4.1.2. Surový peptid byl odštěpen z pryskyřice při současném odstranění chránicích skupin (s výjimkou Pac) postranních řetězců působením 95% (v/v) TFA. Reakci prováděla Anna Povalová podle protokolu, publikovaném v její bakalářské práci [118].

5.1.3. Konverze terminální karboxylové skupiny peptidu Boc-G-F-F-Y(OtBu)-T(OtBu)-P-K(Pac)-T(OtBu)-S(OtBu)-R(Pmc) na methylester

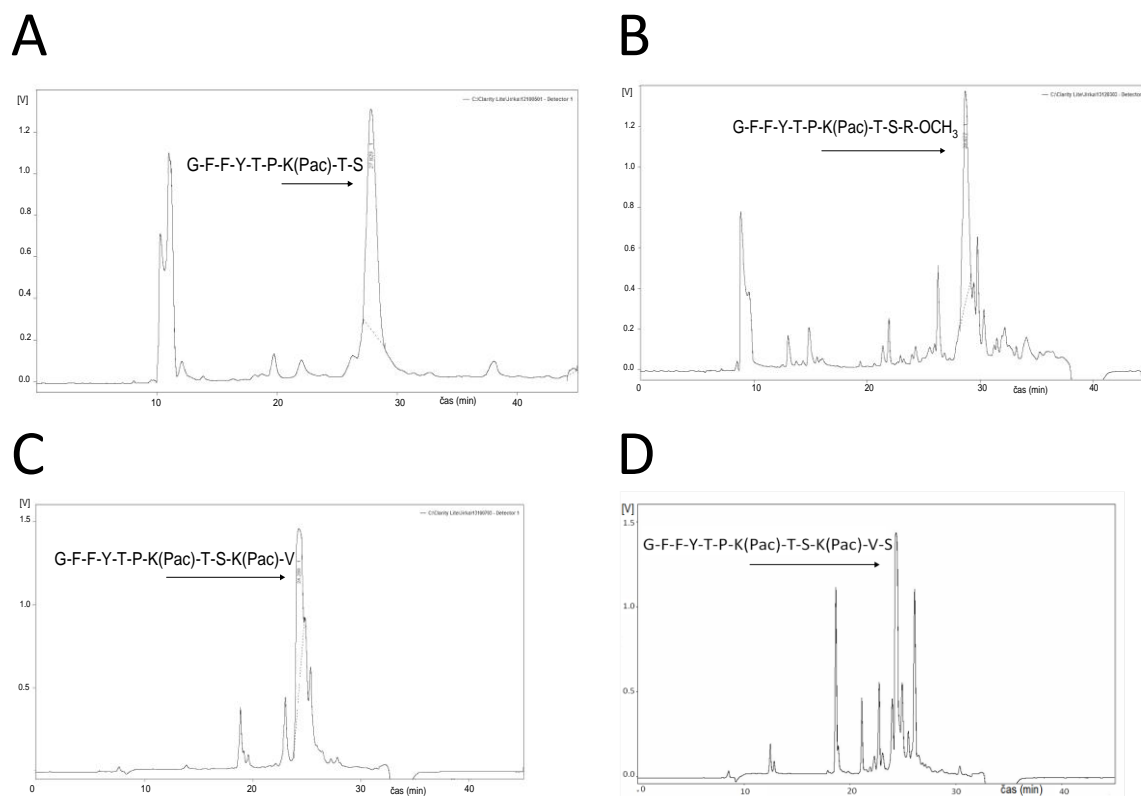
C-koncová karboxylová skupina N-koncového Arg peptidu Boc-G-F-F-Y(OtBu)-T(OtBu)-P-K(Pac)-T(OtBu)-S(OtBu)-R(Pmc), připraveného metodou popsanou v kapitole 4.1.1., byla kvantitativně převedena na methylester působením CH₂N₂. Poté byly odštěpeny chránicí skupiny (s výjimkou Pac) působením 96% (v/v) TFA.

5.2. Purifikace připravených peptidů

Získané surové peptidy byly přečištěny pomocí preparativní RP-HPLC v gradientu 3 (viz Tab. 4, str. 39), za podmínek popsaných v kapitole 4.4.2. Čistota peptidů byla ověřena analytickou RP-HPLC, za podmínek uvedených v kapitole 4.4.1 a ve všech případech byla větší než 95 %. Předpokládaná relativní molekulární hmotnost peptidů byla ověřena hmotnostní spektrometrií. V Tab. 9 (str. 53) jsou uvedeny teoretické a experimentálně získané molekulární hmotnosti připravených peptidů. Na obr. 9 (str. 53) jsou znázorněny chromatografické záznamy z purifikací jednotlivých peptidů.

Tab. 9: Molekulární hmotnosti připravených peptidů, $[M]_{\text{teor.}}$ označuje předpokládanou molekulární hmotnost, $[M]_{\text{exp.}}$ označuje experimentálně získanou hodnotu molekulární hmotnosti.

Peptid	$[M_r]_{\text{teor.}}$	$[M_r]_{\text{exp.}}$
G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S	1165,3	1165,56
G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-OCH ₃	1335,7	1335,7
G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V	1510,7	1509,75
G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V-S	1596,8	1596,8



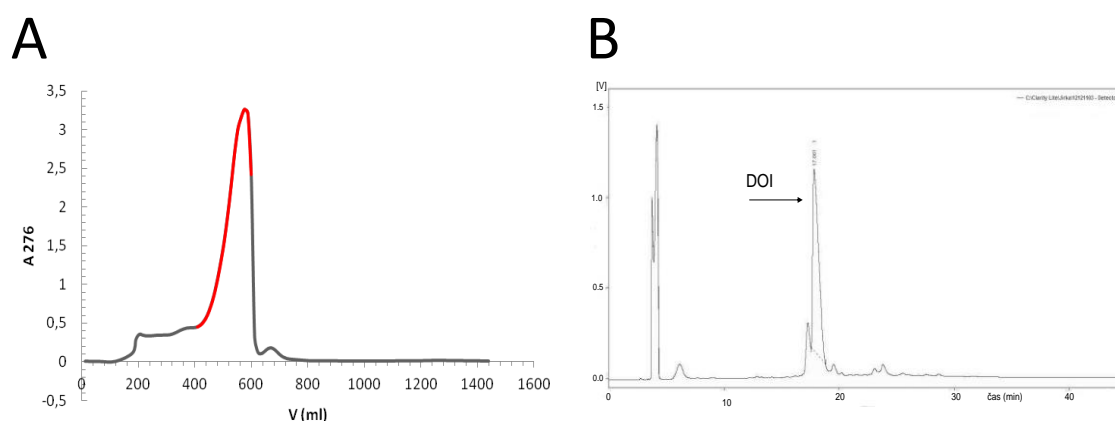
Obr. 9: Chromatografické záznamy z přečištění připravených peptidů pomocí RP-HPLC, vrcholy elučního maxima byly ručně „sbírány“ a analyzovány hmotnostní spektrometrií. Vrcholy elučního maxima, odpovídající peptidům, jsou vyznačeny. (A) preparace G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S; (B) G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-R-OCH₃; (C) G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V; (D) G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T-S-K(Pac)-V-S

5.3. Příprava desoktapeptid^{B23-30}insulinu

Komerčně získaný vepřový insulin byl zbaven iontů Zn^{2+} způsobem popsáním v kapitole 4.3.1. Z 1,00 g vepřového insulinu se podařilo získat 0,90 g insulinu zbaveného Zn^{2+} , což odpovídá výtěžku 90 %.

Koncový oktapeptid vepřového insulinu byl odštěpen pomocí TPCK-trypsinu za podmínek popsanych v kapitole 4.3.2. Z pelety po enzymovém štěpení byl DOI izolován elucí 10% (v/v) kyselinou octovou gelovou chromatografií na koloně Sephadexu G50 o rozměrech 100×7 cm s průtokem 1 ml/ min.

Eluční profil gelové chromatografie je zobrazen na obr. 10 A. Frakce, odpovídající elučnímu objemu 408-600 ml, byly spojeny, lyofilizovány a následně přečištěny za použití preparativní RP-HPLC v gradientu 4 (viz Tab. 4, str. 39). Chromatografický záznam z preparace DOI preparativní RP-HPLC je zobrazen na obr. 10 B. Celkový výtěžek čistého peptidu byl přibližně 55,5 %. Přítomnost DOI v izolované frakci byla potvrzena hmotnostní spektrometrií. Čistota produktu byla ověřena analytickou RP-HPLC v gradientu 1 (viz Tab. 3, str. 38), přičemž čistota látky byla větší než 95 %.



Obr. 10: (A) Eluční profil gelové chromatografie reakční směsi po štěpení vepřového insulinu trypsinem. Eluce byla provedena 10% (v/v) kyselinou octovou na koloně Sephadex G50. Frakce 34-50 obsahovaly DOI, příslušná oblast je v grafu znázorněna (odpovídá elučnímu objemu 408-600 ml); (B) Chromatografický záznam z přečištění DOI pomocí RP-HPLC. Vyznačený vrchol elučního maxima s retenčním časem byl ručně „sbírán“ a jeho molekulární hmotnost byla potvrzena hmotnostní spektrometrií.

Tab. 9: Porovnání očekávané a experimentálně získané monoizotopické molekulární hmotnosti vytvořeného DOI.

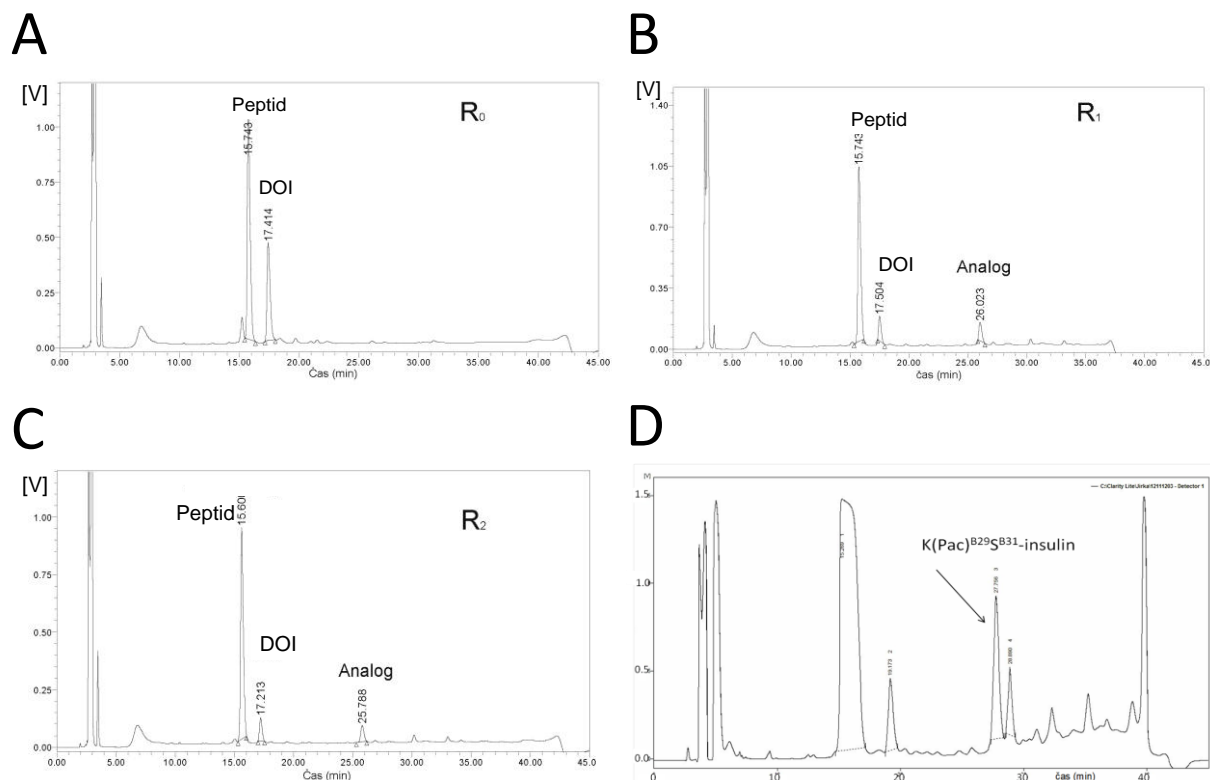
	$[M_r]_{\text{teor.}}$	$[M_r]_{\text{exp.}}$
DOI	4862,2	4862,2

5.4. Enzymová semisyntéza

5.4.1. Semisyntéza K(Pac)^{B29}S^{B31}-insulinu

K přípravě S^{B31}-insulinu byla použita metoda enzymové semisyntézy dle Svobody a kol. [121] a dle Žákové a kol. [119] za podmínek popsanych v kapitole 4.6.1. Enzymovým připojením syntetického nonapeptidu vznikl analog lidského insulinu, jehož C-konec řetězce B je prodloužen o aminokyselinu Ser (S^{B31}insulin). Postranní řetězec Lys byl chráněn Pac-chránící skupinou. Semisyntéza probíhala po dobu 4 hod při laboratorní teplotě v prostředí 55% DMF. Průběh reakce byl sledován analytickou RP-HPLC v gradientu 1 (Tab. 3, str. 38). Po skončení reakce byl analog oddělen z reakční směsi

preparativní RP-HPLC v gradientu 4 (viz Tab. 4, str. 39) a následně byla jeho přítomnost potvrzena hmotnostní spektrometrií. Výtěžek reakce (Tab. 10, str. 56) byl vztažen na množství limitující složky, vstupujícího DOI. Na obr. 11 jsou znázorněny chromatografické záznamy z průběhu semisyntetické reakce.

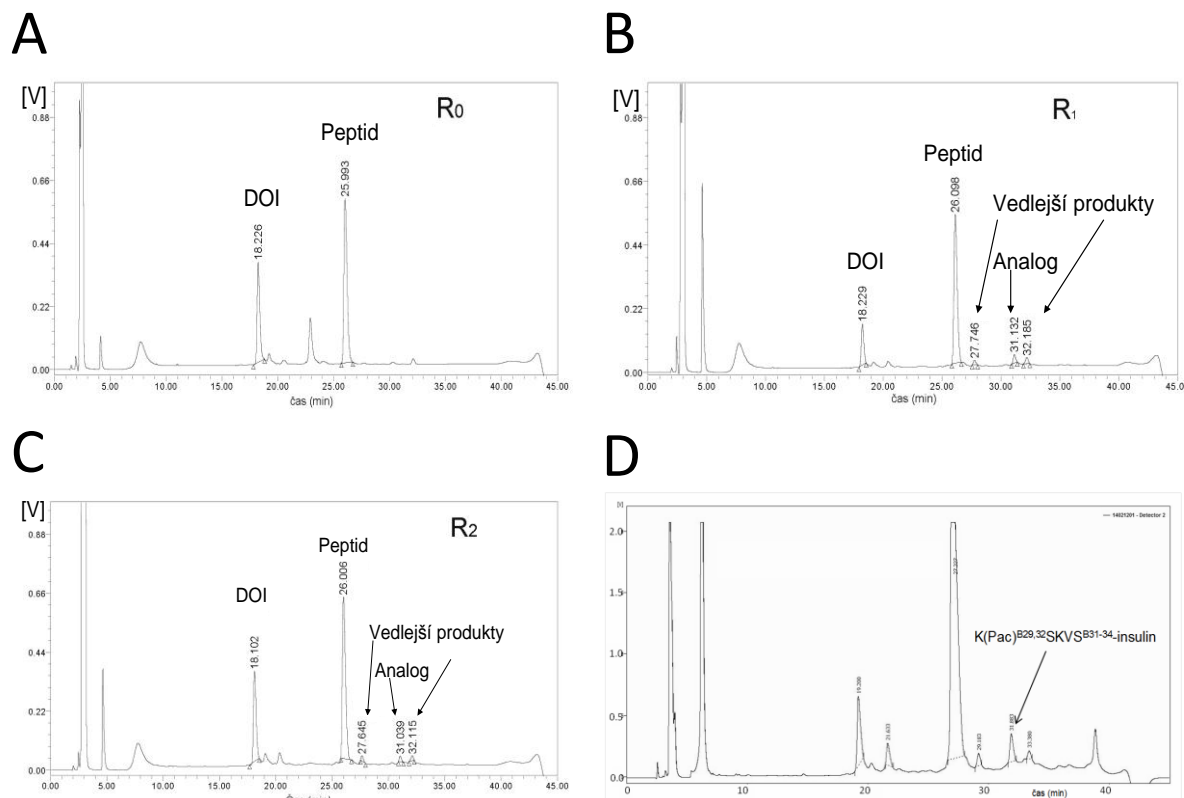


Obr. 11: Chromatografické záznamy z průběhu enzymové semisyntézy S^{B31} -insulinu; (A) analýza výchozí reakční směsi před přidáním TPCK-trypsinu, (B) analýza reakční směsi po 2 hod, (C) analýza reakční směsi po 4 hod těsně před ukončením reakce. Chromatografické záznamy byly pořízeny analytickou RP-HPLC v gradientu 1 (viz Tab. 3, str. 38), (D) chromatografický záznam z preparace reakční směsi; Preparace byla prováděna preparativní RPHPLC v gradientu 4 (viz Tab. 4, str. 39)

5.4.2. Semisyntéza $K(Pac)^{B29}SR^{B31-32}$ -, $K(Pac)^{B29}SK(Pac)V^{B31-33}$ - a $K(Pac)^{B29}SK(Pac)VS^{B31-34}$ -insulinu

K přípravě analogů insulinu, vycházejících z hydrofobních peptidů (obsahujících 2 Pac-chránící skupiny) byla použita metoda enzymové semisyntézy dle Nakagawy a Tagera [122] za podmínek popsanych v kapitole 4.6.2. Připojením syntetických peptidů vznikly analogy insulinu $K(Pac)^{B29}SR^{B31-32}$ -, $K(Pac)^{B29}SK(Pac)V^{B31-33}$ - a $K(Pac)^{B29}SK(Pac)VS^{B31-34}$ -insulin. Postranní řetězce Lys byly chráněny Pac-chránící skupinou. Syntetické reakce probíhaly v prostředí 35% (v/v) DMA, 35% (v/v) butan-1,4-diol a 0,06M Tris/HCl (pH 8,0) po dobu od 24 do 42 hodin. Jejich průběh byl monitorován analytickou RP-HPLC v gradientu 1 (viz Tab. 3, str. 38). Po skončení reakce byly analogy z reakčních směsí odděleny preparativní RP-HPLC v gradientu 3 (viz Tab. 4, str. 39). Jejich přítomnost v izolované frakci byla potvrzena hmotnostní spektrometrií. Výtěžek reakce byl vztažen

na množství limitující složky, přidávaného DOI. Na obr. 12. jsou znázorněny chromatografické záznamy modelového příkladu z průběhu semisyntetické reakce. V Tab. 10 jsou uvedeny výtěžky jednotlivých reakcí.



Obr. 12: Chromatografické záznamy z průběhu semisyntetické reakce K(Pac)^{B29}SK(Pac)VS^{B31-34}-insulinu; (A) analýza výchozí reakční směsi před přidáním TPCK-trypsinu (R₀). (B) analýza reakční směsi po 22 hod (R₁), (C) analýza reakční směsi před ukončením po uplynutí 42 hod (R₂). Chromatografické záznamy byly pořízeny analytickou RP-HPLC v gradientu 1 (viz tav.3, str. 38) (D) chromatografický záznam reakční směsi při preparaci na RP-HPLC v gradientu 4 (viz Tab.4, str. 39).

Tab. 10: Výsledky semisyntetických reakcí analogů insulinu

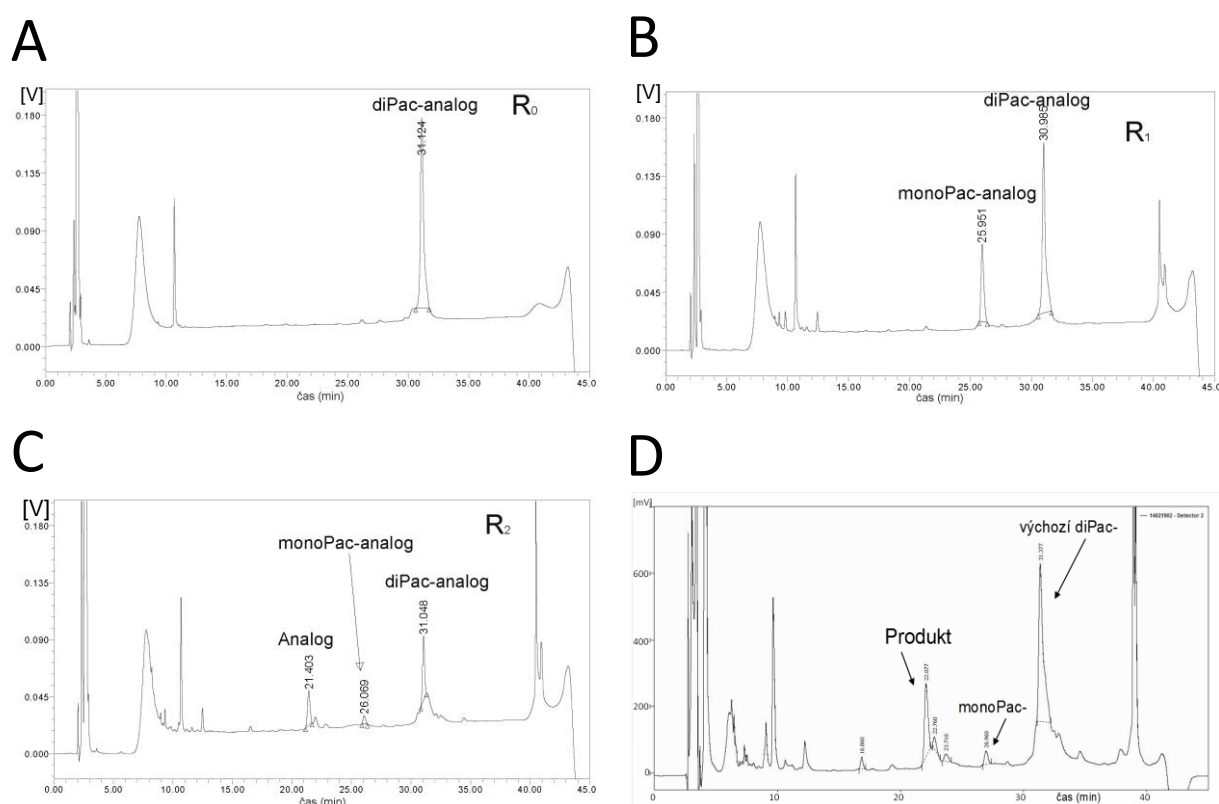
Analog insulinu	použitý peptid	dobu reakce [hod]	Výtěžek	$[M_r]_{\text{teor.}}$	$[M_r]_{\text{exp.}}$
K(Pac) ^{B29} S ^{B31} -insulin	X-S	4	11 %	6008,7	6008,7
K(Pac) ^{B29} SR ^{B31-32} -insulin	X-S-R-OCH ₃	24	5 %	6164,8	6164,8
K(Pac) ^{B29} SK(Pac)V ^{B31-33} -insulin	X-S-K(Pac)-V	24	9,1 %	6358,3	6358,9
K(Pac) ^{B29} SK(Pac)VS ^{B31-34} -insulin	X-S-K(Pac)-V-S	42	9,7 %	6441,0	6441,0

* jako X je označen C-koncový oktapeptid řetězce B lidského insulinu: G-F-F-Y-T-P-K(Pac)-T

5.4.3. Odstranění chránící fenylacetylové skupiny

Při enzymové semisyntéze byly Lys připravených peptidů chráněny fenylacetylovou skupinou, aby bylo zabráněno tryptickému rozštěpení v průběhu semisyntézy. Výhodou při použití chránící skupiny Pac oproti jiným chránícím skupinám

jsou mírné podmínky, během kterých je možné ji odstranit. Chránící skupiny byly odštěpeny enzymem penicilinamidohydrolasou za reakčních podmínek uvedených v kapitole 4.6.3. Reakce trvala od 4 do 10 hod u analogů, které obsahovaly jednu chránící skupinu, a od 27 do 29 hod u analogů se dvěma chránícími skupinami. Průběh reakce byl monitorován analytickou RP-HPLC v gradientu 1 (viz Tab. 3 str. 38). Na obr. 13 je znázorněn modelový průběh reakce odstranění fenylacetylové skupiny z analogu obsahujícího dvě chránící skupiny. Výsledný analog byl z reakční směsi preparován za použití preparativní RP-HPLC v gradientu 4 (viz Tab. 4, str. 39). Identifikace jednotlivých analogů byla provedena hmotnostní spektrometrií.

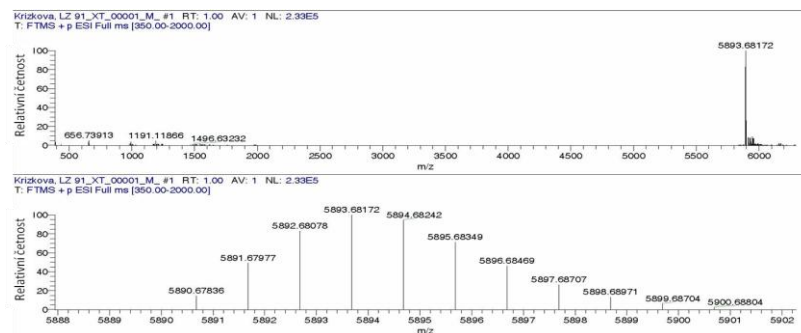


Obr. 13: Chromatografické záznamy z průběhu deprotekční reakce analogu, obsahujícího dvě Pac-chránící skupiny (K(Pac)^{B29}SK(Pac)VS^{B31-34}insulinu). (A) analýza reakční směsi před přidáním penicilinamidohydrolasy (R₀), (B) analýza reakční směsi po uplynutí 5 hod od počátku reakce (R₁), (C) analýza reakční směsi těsně před ukončením reakce, po 27 hod (R₂). Chromatografické záznamy byly pořízeny analytickou RP-HPLC v gradientu 1 (viz Tab. 3, str. 38) (D) chromatografický záznam z preparace hotového analogu preparativní RP-HPLC v gradientu 4 (viz Tab. 4, str. 39).

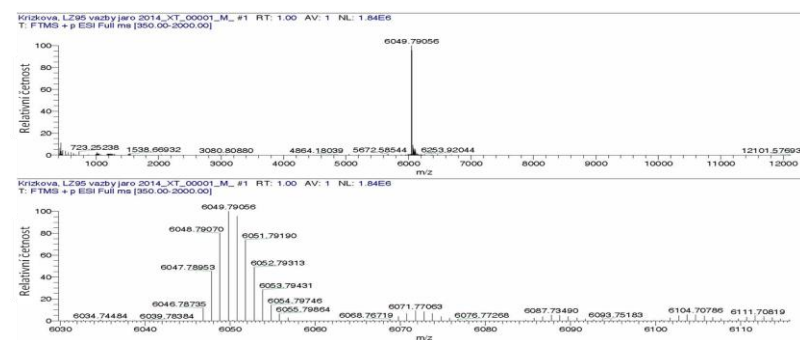
Tab. 11. Výsledky a výtěžky reakce odstranění fenylacetylové chránící skupiny

Vytvořený analog insulinu	doba reakce [hod]	výtěžek	$[M]_{\text{teor.}}$	$[M]_{\text{exp.}}$
S ^{B31} insulin	4	46 %	5890,7	5890,7
SR ^{B31-32} insulin	10	6,8 %	6046,8	6046,8
SKV ^{B31-33} insulin	29	31 %	6117,8	6117,8
SKVS ^{B31-34} insulin	27	29 %	6204,8	6204,9

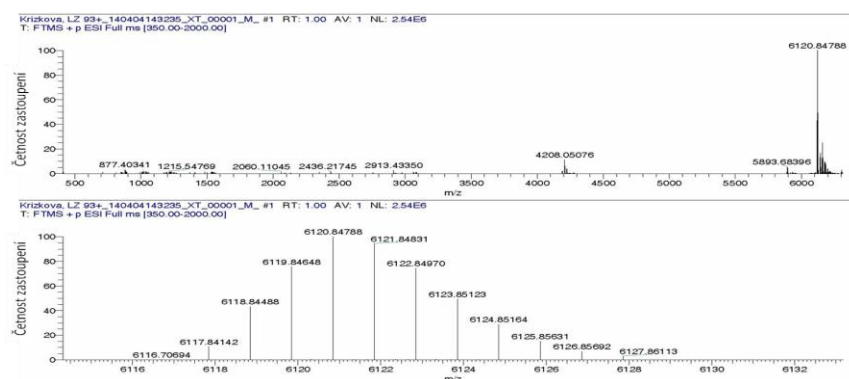
A



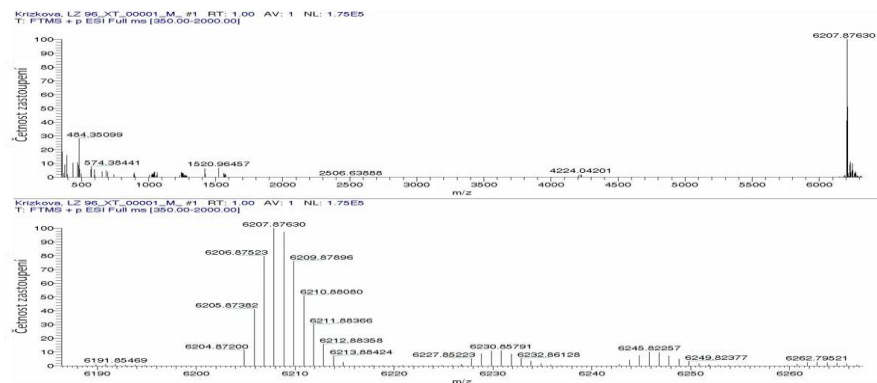
B



C



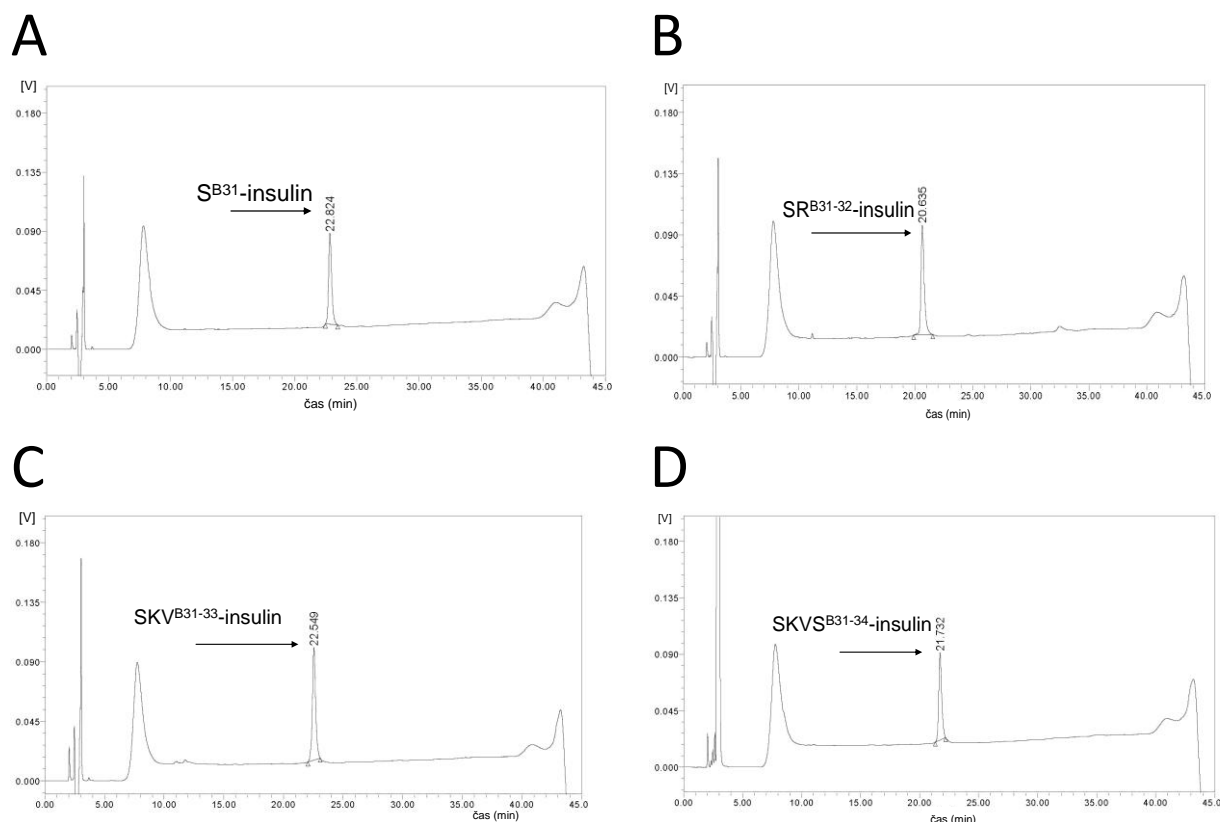
D



Obr. 14. Hmotnostní spektra vytvořených analogů měřená metodou ionizujícího „elektro-spreje“ na přístroji LTQ Orbitrap XL: (A) S^{B31}-insulin, M_r = 5890,67836; (B) SR^{B31-32}-insulin M_r = 6046,78735, (C) SKV^{B31-33}-insulin M_r = 6117,84142, (D) SKVS-B31-34-insulin M_r = 6204,87200.

5.4.4. Stanovení čistoty připravených analogů insulinu

Čistota připravených látek byla ověřena analytickou RP-HPLC za podmínek uvedených v kapitole 4.4.1. v gradientu 1 (viz Tab. 3, str. 38). U všech připravených analogů byla stanovena čistota vyšší než 95 %. Výťažky přípravy jednotlivých analogů insulinu jsou shrnuty v Tab. 12. Na obr. 15 jsou uvedeny chromatografické záznamy analýzy čistoty připravených analogů insulinu.



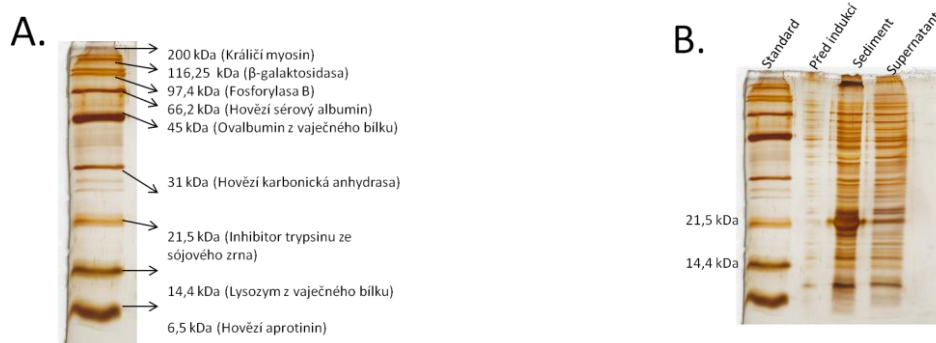
Obr. 15: Chromatografické záznamy z analýzy čistoty připravených analogů insulinu, provedené analytickou RP-HPLC v gradientu 1 (viz Tab. 3, str. 38). (A) S^{B31} -insulin; (B) SR^{B31-32} -insulin; (C) SKV^{B31-33} -insulin; (D) $SKVS^{B31-34}$ -insulin.

Tab. 12: Výťažky přípravy analogů insulinu s ohledem na limitující složku reakčních kroků.

Analog insulinu	Výtěžky reakcí
S^{B31} -insulin	5,2 %
SR^{B31-32} -insulin	0,3 %
SKV^{B31-33} -insulin	2,8 %
$SKVS^{B31-34}$ -insulin	2,8 %

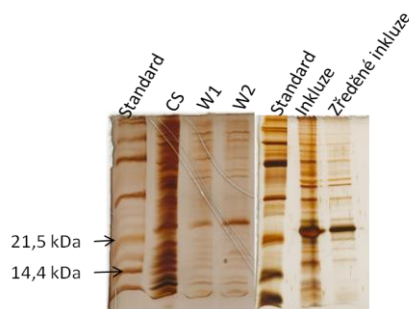
5.5. Rekombinantní příprava Gly⁻¹IGF-II

Gly⁻¹IGF-II byl připraven metodou rekombinantní přípravy proteinů v bakteriích *Escherichia coli*. Kompetentní buňky BL21(DE3) byly transformovány plasmidem, obsahujícím gen pro Gly⁻¹IGF-II ve fúzi s proteinem His₆GB1. Transformace probíhala metodou tepelného šoku, za podmínek popsanych v kapitole 4.7.1. Expres rekombinantního proteinu byla řízena T7 promotorem. Plasmid obsahoval, mimo gen pro His₆GB1-Gly⁻¹IGF-II, informaci o rezistenci ke kanamycinu, což umožnilo selekci úspěšně od neúspěšně transformovaných buněk. Transformované buňky byly kultivovány v růstovém médiu, jak je popsáno v kapitole 4.7.2. Když hodnota jejich OD₅₅₀ přesáhla 1,0, byla indukována exprese proteinu pro T7-polymerasu přidavkem ethylglukoronidu. Při poklesu růstu hodnoty OD₅₅₀ byla inkubace zastavena. Na obr. 17 B je znázorněn výsledek elektroforetické analýzy bakteriálního materiálu během kultivace. Relativní molekulární hmotnost His₆GB1-Gly⁻¹IGF-II byla vypočtena přibližně na 17000 Da. Na obr. 17 B je patrná přítomnost proteinu o sledované hmotnosti v nerozpustné frakci (sedimentu). Z jednoho litru kultivačního média bylo získáno 4,7 – 9,2 g mokré biomasy.



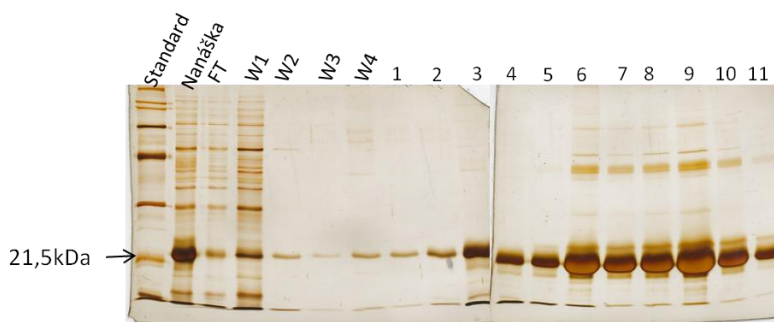
Obr. 17: (A) Molekulární hmotnosti proteinů v používané standardní komerční směsi pro SDS elektroforézu, BIO-RAD 161-0317; (B) elektroforetický záznam z analýzy proteinů v bakteriální suspenzi před přidavkem ethylglukoronidu, v odstředěném sedimentu a supernatantu po ukončení kultivace odstředěním

Protein His₆GB1-Gly⁻¹IGF-II vytvářel v cytosolu inkluzní tělíska, jejichž přítomnost byla potvrzena na fázově kontrastním mikroskopu. Inkluzní tělíska byla z bakteriálního materiálu izolována, metodou popsanou v kapitole 4.7.3. Přítomnost izolovaného proteinu v inkluzích byla potvrzena analytickým provedením elektroforézy s použitím 15% akrylamidového gelu za podmínek, popsanych v kapitole 4.8. Výsledek analytické elektroforézy je znázorněn na obr. 18 (str. 61). Z jednoho litru kultivačního média bylo získáno 0,4 - 0,8 g inkluzních tělísek.



Obr. 18: Elektroforetický záznam z analýzy obsažených proteinů ve frakcích při izolaci inkluzí; CS- supernatant po prvním odstředění po dezintegraci bakteriálního materiálu, W1 – supernatant získaný odstředěním rozpuštěné pelety po prvním odstředění, W2 – supernatant získaný odstředěním rozpuštěné pelety po druhém odstředění, Inkluze – peleta vzniklá při opakovaném odstředování.

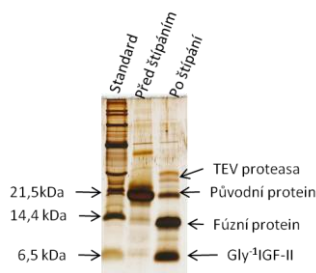
Proteiny s nenativní konformací uvnitř inkluzních tělísek byly denaturovány v roztoku 8 M močoviny a 0,02% β -merkaptoethanolu. Z denaturované směsi proteinů byl rekombinantní protein izolován afinitní chromatografií na koloně s chelatovanými ionty Ni^{2+} navázanými na agarosovém nosiči. Rekombinantní protein byl spontánně „sbalen“ do nativní konformace za podmínek popsanych v kapitole 4.7.4. Z kolony byl izolovaný protein vytěsňen stoupající koncentrací imidazolu v elučním roztoku. Frakce získané při afinitní chromatografii byly analyzovány analytickým provedením elektroforézy v Tris-tricinovém systému pufrů (viz kapitola 4.8.) Imidazol byl z roztoku odstraněn dialýzou za podmínek popsanych v kapitole 4.7.5. Na obr. 19 jsou znázorněny elektroforetické záznamy z analýzy jednotlivých frakcí po afinitní chromatografii. Frakce 3-11 byly spojeny a použity k další preparaci.



Obr. 19: Elektroforetické záznamy z analýzy obsahu frakcí získaných při provedení afinitní chromatografie na koloně s chelatovanými ionty Ni^{2+} ; Nanáška- směs nanesená na kolonu, FT – materiál, který protekl kolonou bez zachycení, W1 – frakce proteklá kolonou při eluci roztokem 8 M močovina, 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,0, W2 - frakce proteklá kolonou při eluci roztokem 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,0, W3 - frakce proteklá kolonou při eluci roztokem 5 mM imidazol, 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 1-11 – frakce vytěsňené z kolony stoupajícím gradientem imidazolu (50 mM-0,5 M) v elučním roztoku 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,0.

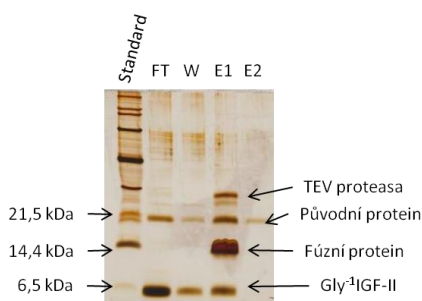
Fúzní protein His₆GB1 byl odštěpen TEV-proteasou za podmínek uvedených v kapitole 4.7.6. Úspěšné oddělení His₆GB1 bylo potvrzeno analytickým provedením

elektroforézy za použití Tris-tricinového systému pufrů způsobem, popsaným v kapitole 4.8.



Obr. 20: Elektroforetický záznam analýza obsahu frakcí získaných v průběhu odštěpení fúzního proteinu TEV-proteasou.

Gly¹IGF-II byl z reakční směsi oddělen afinitní chromatografií za podmínek popsaných v kapitole 4.7.7. TEV-proteasa i His₆GB1 obsahovaly sekvenci několika His, díky kterým zůstaly zachycené na koloně. Odštěpený Gly¹IGF-II protekl kolonou. Přítomnost proteinu s požadovanou hodnotou M_r (7521,53) byla ověřena v izolované frakci analytickým provedením elektroforézy v Tris-tricinovém systému pufrů za podmínek uvedených v kapitole 4.8. Na obr. 21 je znázorněn elektroforetický záznam z analýzy frakcí po afinitní chromatografii. Frakce FT a W obsahovaly protein o požadované hmotnosti a byly použity k dalšímu zpracování.

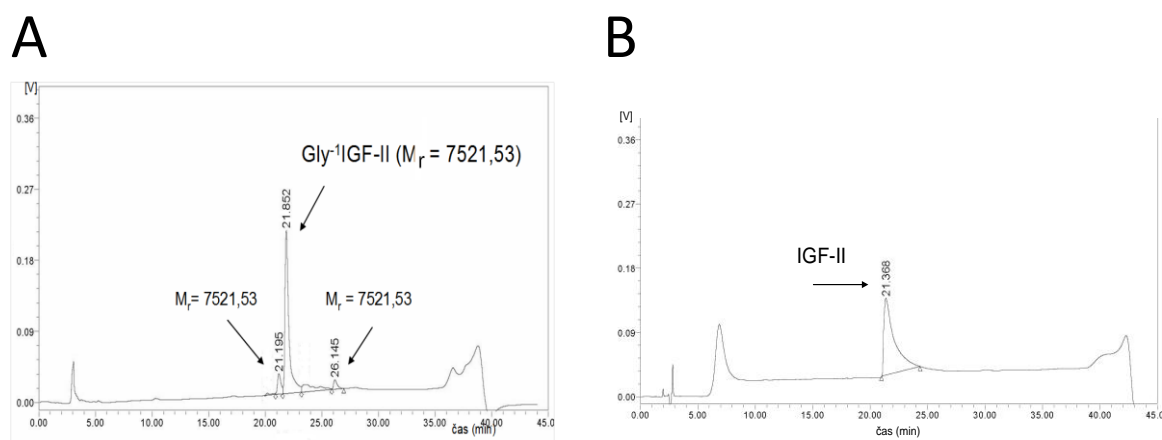


Obr. 21: Elektroforetický záznam z analýzy jednotlivých frakcí, získaných při provedení afinitní chromatografie na koloně s chelátovanými ionty Ni²⁺ na agarosovém gelu; FT- materiál, který protekl kolonou bez zachycení, W - materiál, který protekl kolonou po eluci roztokem 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,0, E1,2 – materiál, který se vytěsnil z kolony při eluci roztokem 0,5 M imidazolu v 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8,0.

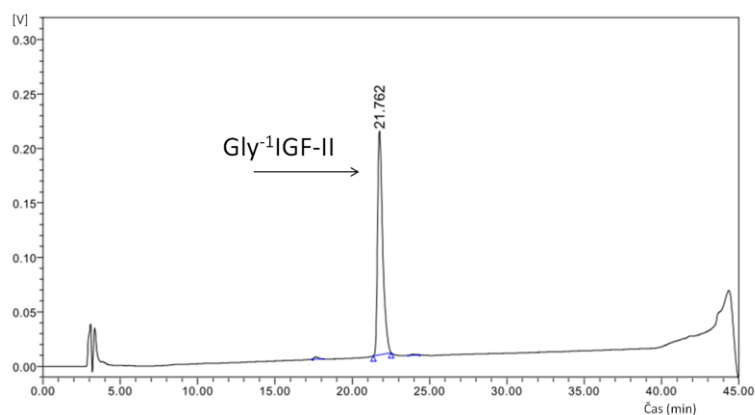
Soli z roztoku proteinu Gly¹IGF-II byly odstraněny použitím mikrokolony CHROMABOND naplněné silikagelem s navázanými butylovými skupinami (C4). Chromatografií přes mikrokolonu byly odděleny polární a nepolární fáze roztoku. Nepolární frakce byla z kolony vytěsněna 80% acetonitrilem v 0,1% TFA. Přítomnost Gly¹IGF-II v nepolární frakci byla ověřena analytickou RP-HPLC v gradientu 2 (viz Tab. 3, str. 38). Protein byl přečištěn preparativní RP-HPLC na semipreparativní koloně v gradientu 5. (viz Tab. 4, str. 39) Identifikace proteinu v izolované frakci byla provedena

hmotnostní spektrometrií a čistota výsledného produktu byla ověřena analytickou RP-HPLC v gradientu 2 (viz Tab. 3, str. 38). Na obr. 22 jsou porovnány chromatografické záznamy izolované směsi Gly⁻¹IGF-II před přečištěním a komerčně dostupného IGF-II. Retenční čas maxima elučního vrcholu komerčně dostupného IGF-II (21,358. min) je srovnatelný s vrcholy elučních maxim s retenčními časy 21,195. a 21,852. min izolované směsi. Chromatografický záznam z analytického ověření čistoty produktu je zobrazen na obr. 23. Hmotnostní spektra, potvrzující přítomnost izolovaného proteinu jsou uvedena na obr. 24 na následující straně.

Výtěžek exprese Gly⁻¹IGF-II se pohyboval okolo 1 mg / 1 l kultivačního média.

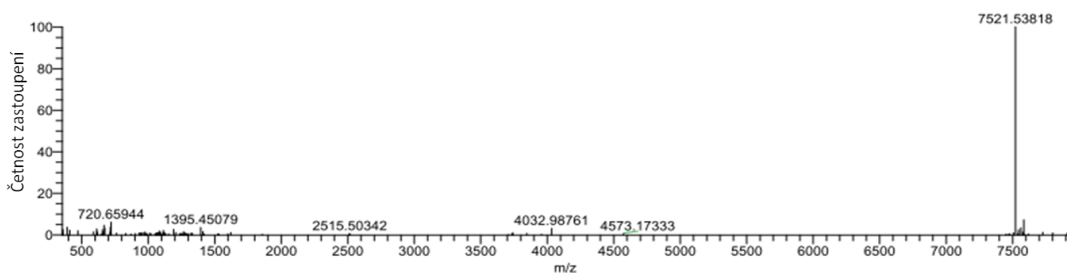


Obr. 22: Porovnání chromatografických záznamů izolovaného Gly⁻¹IGF-II (A) a komerčně dostupného IGF-II (B). Záznamy byly získány analytickou RP-HPLC v gradientu 2 (viz Tab. 3, str. 38).

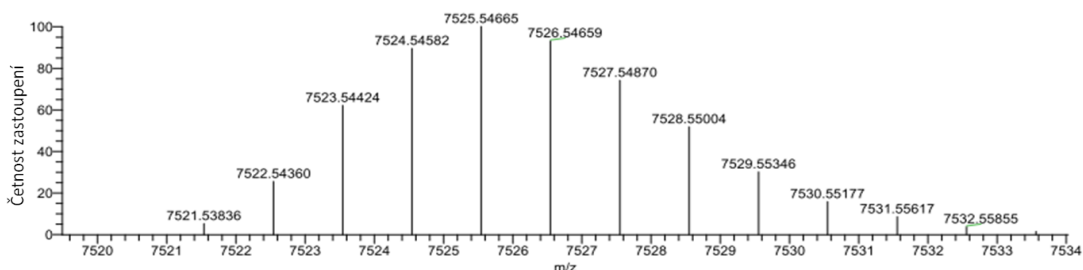


Obr. 23: Chromatografický záznam z analýzy čistoty izolovaného Gly⁻¹IGF-II. Čistota byla vyšší než 98%. Chromatografický záznam byl získán analytickým provedením RP-HPLC v gradientu 2 (viz Tab. 3, str. 38).

Křížková, KK-1 vazby podzim_XT_00001_M_140404134544 #2 RT: 2.00 AV: 1 NL: 4.61E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



Křížková, KK-1 vazby podzim_XT_00001_M_140404134544 #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 8.23E4
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



Obr. 24: Hmotnostní spektra Gly⁻¹IGF-II měřené metodou ionizujícího „elektro-spreje“ na přístroji LTQ Orbitrap XL: Byla stanovena relativní molekulární hmotnost 7521,53836.

5.6. Vazebné testy analogů insulinu a IGF-II s IR-A, IR-B a IGF-1R *in vitro*

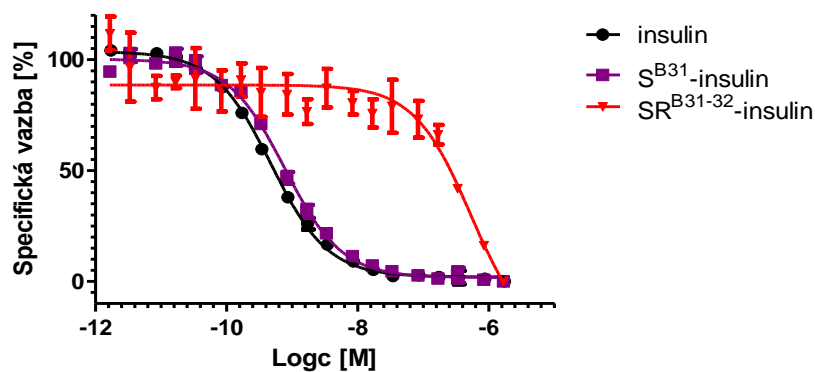
5.6.1. Testování vazebné afinity analogů insulinu a IGF-II k IR-A *in vitro*

Vazebné afinity připravených látek k isoformě A insulinového receptoru byly testovány na linii lidských lymfocytů IM-9 metodou popsanou v kapitole 4.9.2. Testování analogů bylo provedeno v duplikátech minimálně ve třech opakováních (mimo SR^{B31-32}insulinu, u kterého byly provedeny jen dvě opakování kvůli nedostatku materiálu). Výsledky byly vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 5.0. Ze získaných dat byla pro každý analog vytvořena vazebná křivka a byly určeny hodnoty disociačních konstant. Výsledky vazebných testů jsou vyobrazeny v Tab. 13. Na obr. 25 jsou uvedeny vazebné křivky testovaných analogů.

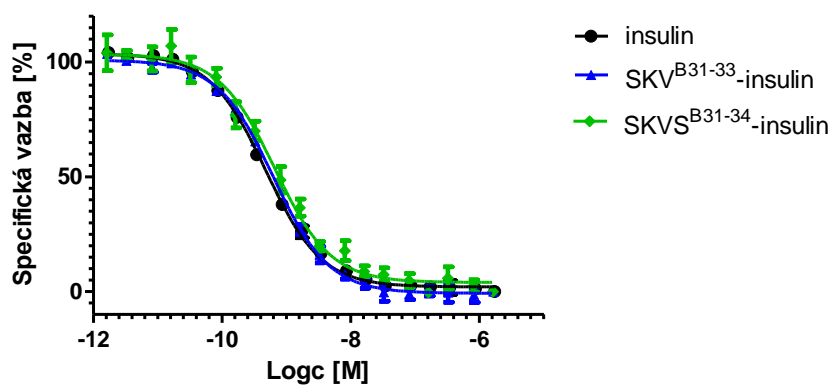
Tab. 13: Vazebné afinity připravených analogů, insulinu a IGF-II k IR-A

Analog	insulinu/IGF	$K_d \pm SEM$ [nM]	Specifická vazba [%]	počet měření [n]
Insulin		$0,47 \pm 0,05$	$100 \pm 10,6$	4
S ^{B31} insulin		$0,77 \pm 0,09$	$61,0 \pm 7,1$	3
SR ^{B31-32} insulin		534	0,09	2
SKV ^{B31-33} insulin		$0,60 \pm 0,02$	$78,3 \pm 2,6$	3
SKVS ^{B31-34} insulin		$0,69 \pm 0,13$	$68,1 \pm 12,8$	3
IGF-II		$6,99 \pm 0,41$	$6,7 \pm 0,4$	7
Gly ⁻¹ IGF-II		$8,09 \pm 0,19$	$5,8 \pm 0,1$	3

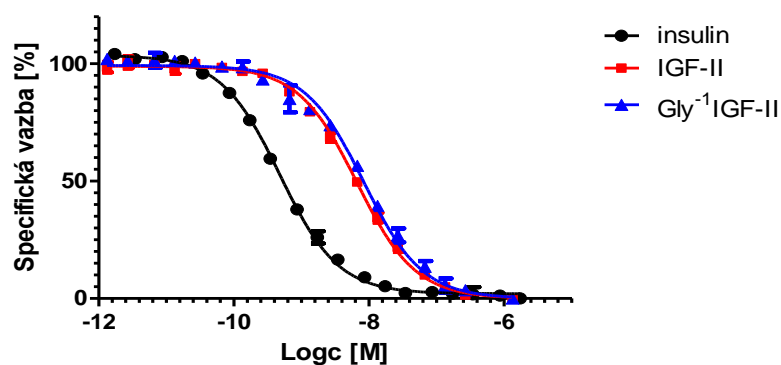
A



B



C



Obr. 25: Porovnání vazebných křivek k IR-A lidského insulinu a (A) analogů S^{B31}-, SR^{B31-32}- insulinu; (B) analogů SKV^{B31-33}-, SKVS^{B31-34}-insulinu; (C) IGF-II a Gly⁻¹-IGF-II; Vytvořeno v programu GraphPad Prism 5.0.

5.6.2. Testování vazebné afinity analogů insulinu a IGF-II k IR-B *in vitro*

Vazebná afinita k isoformě B insulinového receptoru byla testována na linii R⁻ buněk transfekovaných genem pro lidský IR-B. Testování bylo provedeno v duplikátech a ve třech opakováních. Výsledky byly vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 5.0. Ze získaných dat byly vytvořeny vazebné křivky jednotlivých analogů a stanoveny jejich disociační konstanty. V Tab. 14 a 15 jsou uvedeny stanovené disociační konstanty a na obr. 27 jsou vyobrazeny vazebné křivky testovaných analogů.

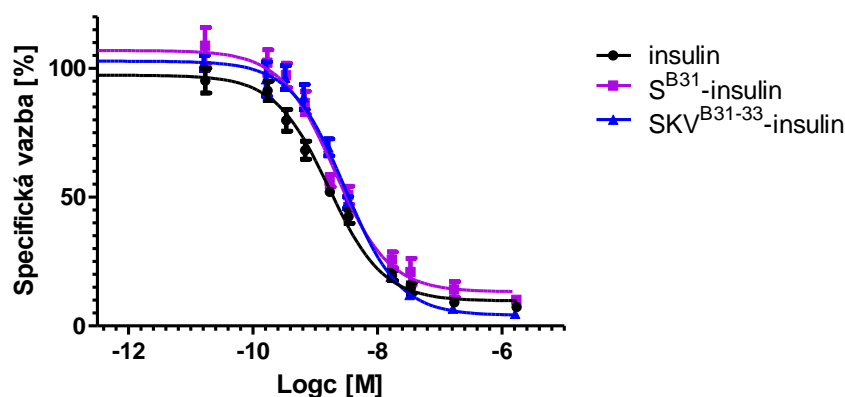
Tab. 14: Vazebné afinity připravených analogů, insulinu a IGF-II k IR-B (inkubace 3 hod – viz kapitola 4.9.5.)

Analog insulinu/IGF	$K_d \pm SEM$ [nM]	Specifická vazba [%]	počet měření [n]
Insulin	$1,42 \pm 0,12$	$100 \pm 8,5$	5
S ^{B31} -insulin	$1,78 \pm 0,16$	$79,8 \pm 7,2$	3
SKV ^{B31-33} -insulin	$2,58 \pm 0,36$	$55,0 \pm 7,7$	3
IGF-II	205 ± 15	$0,69 \pm 0,05$	3
Gly ¹ IGF-II	149 ± 32	$0,95 \pm 0,2$	3

Tab. 15: Vazebné afinity připravených analogů a insulinu k IR-B (inkubace 20 hod – viz kapitola 4.)

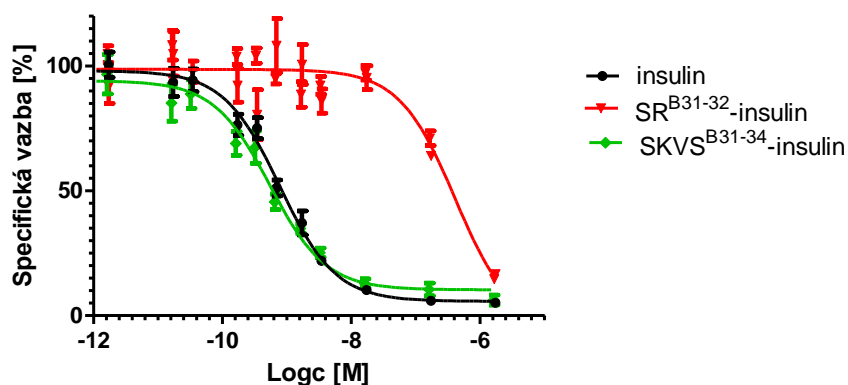
Analog insulinu	$K_d \pm SEM$ [nM]	Specifická vazba [%]	počet měření [n]
Insulin	$0,68 \pm 0,08$	$100 \pm 11,8$	4
SR ^{B31-32} -insulin	356 ± 35	$0,19 \pm 0,02$	3
SKVS ^{B31-34} -insulin	$0,46 \pm 0,06$	148 ± 19	4

A

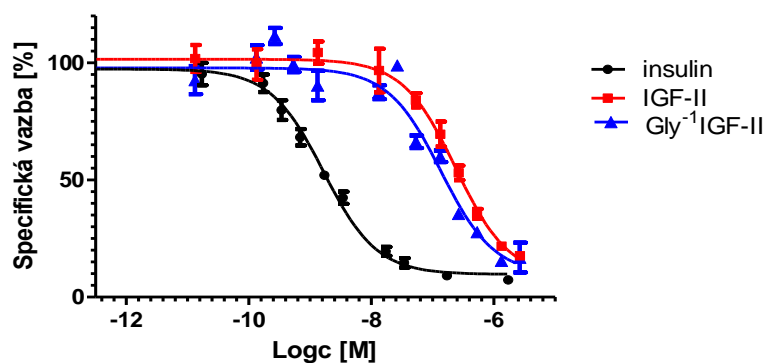


Obr. 26: (A.) Porovnání vazebných křivek k IR-B lidského insulinu a analogů S^{B31}-, SKV^{B31-33}-insulinu; inkubace 3 hod; Vytvořeno v programu GraphPad Prism 5.0.

B



C



Obr. 26 pokrač.: Porovnání vazebných křivek k IR-B lidského insulinu a (B) $\text{SR}^{\text{B31-32}}$ -, $\text{SKVS}^{\text{B31-34}}$ -insulinu inkubace 20 hod; (C) IGF-II a $\text{Gly}^{-1}\text{IGF-II}$ – inkubace 3 hod. Vytvořeno v programu GraphPad Prism 5.0.

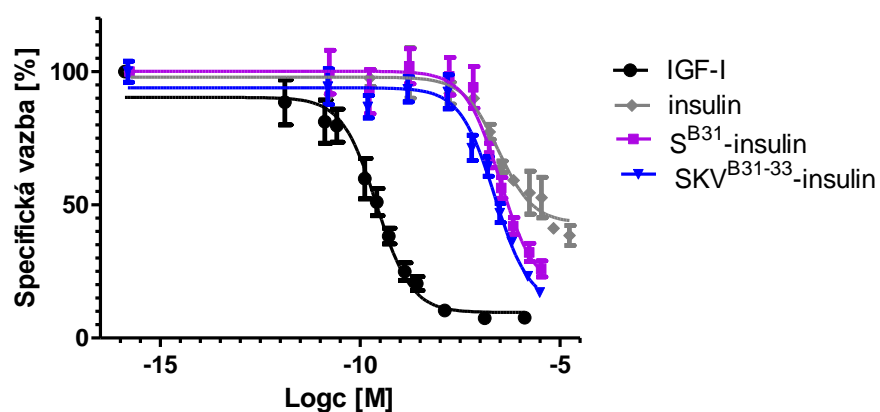
5.6.3. Testování vazebné afinity analogů insulinu a IGF-II k IGF-1R *in vitro*

Vazebná afinita připravených analogů, insulinu a IGF-II k IGF-1R byla testována na linii R^+ buněk transfekovaných genem pro lidský IGF-1R. Testování bylo provedeno v duplikátech, minimálně ve třech opakováních (mimo $\text{SKVS}^{\text{B31-34}}$ -insulin, kdy pro byly nedostatek materiálu provedena jen dvě měření). Výsledky byly vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 5.0. Ze získaných dat byly vytvořeny vazebné křivky jednotlivých analogů a stanoveny jejich disociační konstanty. V Tab. 16 na následující straně jsou uvedeny hodnoty disociačních konstant, na obr. 27 jsou znázorněny vazebné křivky testovaných analogů. Vazebnou afinitu analogu $\text{SR}^{\text{B31-32}}$ -insulinu nebylo možné stanovit pro nedostatek materiálu.

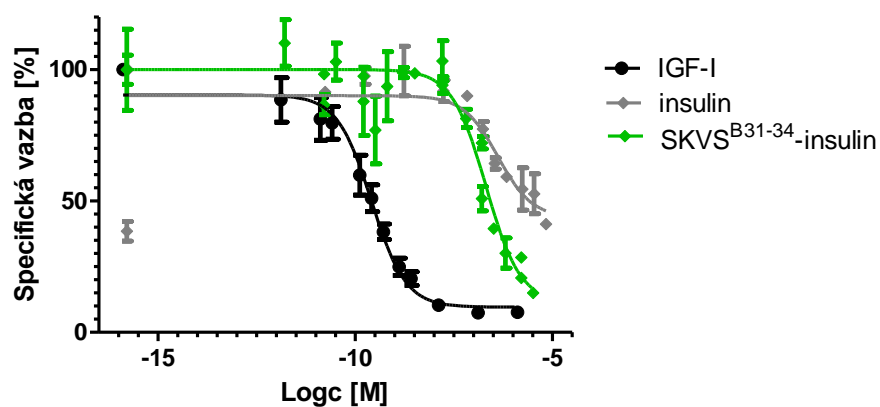
Tab. 16: Vazebné afinity připravených analogů, IGF-I/II a insulinu k IGF-1R

<i>Analog insulinu/IGF</i>	<i>K_d±SEM [nM]</i>	<i>Specifická vazba vzhledem k IGF-I [%]</i>	<i>Specifická vazba vzhledem k insulinu [%]</i>	<i>počet měření [n]</i>
IGF-I	0,24 ± 0,05	100	-	5
Insulin	292 ± 31	0,08 ± 0,009	100	3
S ^{B31} -insulin	280 ± 41	0,09 ± 0,01	104	3
SR ^{B31-32} -insulin	-	-	-	0
SKV ^{B31-33} -insulin	195 ± 33	0,12 ± 0,02	150	3
SKVS ^{B31-34} -insulin	234	0,10	125	2
IGF-II	5,1 ± 1,6	4,71 ± 1,48	-	4
Gly ¹ IGF-II	3,4 ± 0,7	7,06 ± 1,45	-	4

A

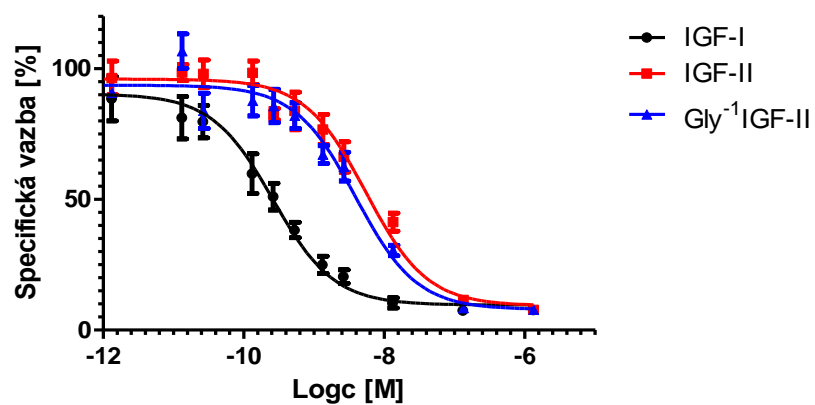


B



Obr. 27 : Porovnání vazebných křivek k IGF-1R lidského IGF-I, lidského insulinu a (A) analogů S^{B31}-, SKV^{B31-33}-insulinu; (B) SKVS^{B31-34}-insulinu Vytvořeno v programu GraphPad Prism 5.0.

C



Obr. 27 pokr.: Porovnání vazebných křivek k IGF-1R (C) lidského IGF-I, IGF-II a Gly⁻¹IGF-II Vytvořeno v programu GraphPad Prism 5.0.

6. DISKUSE

Insulin a IGF-II jsou navzájem si podobné, evolučně spřízněné hormony, jež mají ale v organismu odlišné funkce. Zatímco insulin ovlivňuje metabolismus sacharidů, proteinů a lipidů, IGF-II zejména podporuje růst buněk a jejich diferenciaci. Nicméně jak sekvenční, tak strukturní homologie obou hormonů jim umožňuje do jisté míry interagovat s příslušnými receptory z rodiny tyrosinkinasových receptorů insulinu a IGF-I a ovlivňovat tak funkci jiného hormonu. Jedním z klíčových rozdílů dvou v organismu se vyskytujících isoform insulinového receptoru, IR-A a IR-B, je afinita, se kterou se k nim váže IGF-II a zprostředkovává své biologické účinky. Zatímco k IR-B má afinitu velmi slabou ($K_d \sim 200$ nM), IR-A je pro jeho vazbu významný receptor ($K_d \sim 7$ nM). Předchozí studie odhalily několik klíčových pozic uvnitř domén A a B IGF, které výrazně ovlivňují afinitu k IR-A [106]. Současně se diskutuje, že stejně jako doména C faktoru IGF-I zvyšuje afinitu k IGF-1R, by mohla i doména C faktoru IGF-II zvyšovat afinitu k IR-A [110,113], čímž se zabývá i předkládaná diplomová práce. Předmětem práce bylo sledování vlivu domény C z IGF-II (o primární sekvenci -SRVSRSR-) na afinity k oběma isoformám IR a k IGF-1R. Aby bylo možné studovat vliv pouze domény C z IGF-II, byly jednotlivé z ní odvozené aminokyseliny postupně připojovány k C-konci řetězce B insulinu, tedy na analogické pozice, jaké zaujímají v molekule IGF-II. U těchto hybridních molekul se s prodlužujícím se řetězcem předpokládala zvýšená afinita k IR-A a snížená k IR-B oproti insulinu. Vliv modifikací byl také sledován na afinitě k IGF-1R a porovnáván s přirozeným komerčně dostupným a námi rekombinantně připraveným IGF-II.

Celkem byly připraveny 4 analogy insulinu s řetězcem B prodlouženým o aminokyseliny -S, -SR, -SKV a -SKVS. U tří analogů byl zaměněn arginin za lysin na základě předpokladu, že lysin v této pozici bude dobře mimikovat původní arginin [112]. Nechráněný arginin není možné použít při semisyntetických reakcích, protože by následkem působení trypsinu při semisyntetické reakci došlo k hydrolýze připojovaného peptidu. Zároveň doposud dostupné chránicí skupiny argininu neposkytují možnost jejich následného odstranění, bez výrazného rizika poškození molekuly insulinového analogu. Při substituci argininu lysinem je možné použít fenylacetylovou chránicí skupinu, která je následně z analogu odstraněna působením enzymu penicilinamidohydrolasy při podmínkách šetrných k molekule analogu.

Analogy insulinu byly připraveny metodou enzymové semisyntézy [119,121], vycházející z DOI a koncového oktapeptidu prodlouženého a příslušné aminokyseliny.

Zatímco syntéza S^{B31}-insulinu proběhla dle předpokladů a s relativně vysokým výtěžkem, s rostoucí délkou připojovaného peptidu klesala rozpustnost peptidu v reakční směsi, pro což bylo nutné zavést alternativní metodu [122] vhodnější pro syntézu s hydrofobními peptidy. U analogu SKVS^{B31-34}-insulinu už ale ani tato metoda neposkytla dostatečně vhodné reakční podmínky a nebylo možné reagující složky díky vysoké hydrofobicitě zcela rozpustit. Dlouhá doba reakce ale nakonec umožnila získat produkt, i když s malým výtěžkem (viz Tab.10).

Původní arginin se nachází pouze u SR^{B31-32}-insulinu, kdy byla k ochraně před vzájemným syntetickým spojením několika peptidů použita konverze C-terminální karboxyskupiny na methylester. Esterová skupina měla být po ukončení přípravy odstraněna působením báze za vzniku karboxylové skupiny. K odštěpení esterové skupiny však došlo už během syntetické reakce působením trypsinu, přestože reakce byla provedena za podmínek, které měly podpořit syntetickou funkci enzymu (při nízkém pH a v přítomnosti organického rozpouštědla). Přesto se podařilo z reakční směsi izolovat konečný, původně plánovaný produkt [K(Pac)^{B29}SR^{B31-32}-insulin], avšak účinnost reakce činila jen 5 %.

Chránící fenylacetylová skupina lysinu (Pac) je vhodná při syntézách molekul proteinů, jelikož je specificky enzymově odštěpitelná za šetrných podmínek. V přítomnosti jedné chránící skupiny u analogů došlo k odštěpení během 4-10 hodin. V přítomnosti dvou chránících skupin se původní chráněný produkt během několika hodin změnil na mono-chráněný a odštěpení druhé chránící skupiny bylo pomalé patrně kvůli horší přístupnosti molekuly enzymu ke druhému štěpnému místu, ale také tím, že vzniklý fenylacetyl inhibuje aktivitu penicilinamidohydrolasy. Z těchto dvou důvodů, je potřeba dlouhý čas reakce (27-29 hod) a průběžné přidávání enzymu penicilinamidohydrolasy.

Připojení serinu na C-konec řetězce B insulinu se projevilo ve snížení afinit k oběma typům insulinového receptoru oproti hodnotám přirozeného insulinu, i když pokles vůči isoformě B byl nižší, než jsme očekávali (IR-A: 61,0 %; IR-B: 79,8%). Připojením další aminokyseliny, argininu, došlo k výraznému pádu afinit k oběma isoformám IR (IR-A: 0,09 %; IR-B: 0,19 %). Je možné, že arginin v C-terminální pozici zabraňuje svým postranním řetězcem, případně kladným nábojem dosažení vazebného místa, čímž nedochází k účinnému navázání molekuly na receptor. Ovšem, vysvětlení nízké afinity analogu, zvláště vzhledem k ostatním analogům, obsahujícím lysin, není triviální a bude vyžadovat další studie. Analog SKV^{B31-33}-insulin rovněž vykazoval snížení

afinity k oběma typům IR oproti přirozenému insulinu, přičemž pokles afinity k IR-B byl nepatrně vyšší (IR-A: 78,3 %, IR-B: 55,0 %). To je v souladu s předpokládanou teorií, že s prodlužujícím se řetězcem odvozeným z domény C IGF-II se upřednostní afinita k IR-A oproti IR-B. Připojením další aminokyseliny, serinu, se však vazebné vlastnosti analogu SKVS^{B31-34}-insulinu výrazně změnily. Afinita k IR-A poklesla (68,1 %) na podobnou úroveň jako u analogu SKV^{B31-33}-insulin, ale naopak afinita k IR-B výrazně vzrostla až nad hodnotu přirozeného insulinu (148 %). Příčina tohoto jevu opět není očividná, ale je možné, že prodloužení C-konce řetězce B insulinu o vhodné aminokyseliny nemusí nutně vést ke ztrátě afinity vůči IR, ale naopak může zvýšit afinitu vůči IR-B, pravděpodobně díky interakci s delším úsekem α CT-peptidu, nacházejícího se pouze v této isoformě.

Z naměřených hodnot vyplývá, že afinity k isoformě A insulinového receptoru byly v případě všech analogů nižší v porovnání s přirozeným insulinem, což nasvědčuje tomu, že sledovaná část domény C faktoru IGF-II nemusí hrát významnou roli při vazbě IGF-II na IR-A. Z naměřených hodnot vazebných afinit k IR také vyplývá, že serin v pozici C-terminální aminokyseliny řetězce B je lépe tolerován isoformou B insulinového receptoru než isoformou A.

Všechny testované analogy vykazovaly vyšší afinitu k IGF-1R oproti přirozenému insulinu (100 %), přičemž u delšího řetězce u analogů SKV^{B31-33}-insulin a SKVS^{B31-34}-insulin byly afinity vyšší (150 %, resp. 125 %) než u analogu s jednou připojenou aminokyselinou S^{B31}-insulin (104 %). Kvůli nedostatku materiálu mohly být u analogu SKVS^{B31-34}-insulin provedeny pouze dvě měření, avšak v obou těchto měřeních měl analog vyšší afinitu než přirozený insulin. Afinita analogu SR^{B31-32}-insulinu nebyla s ohledem na nedostatek materiálu k IGF-1R testována.

S ohledem na propad vazebných vlastností SR^{B31-32}-insulinu vůči oběma isoformám IR oproti ostatním analogům a na nečekaně vysokou afinitu SKVS^{B31-34}-insulinu k IR-B vyvstávají hned dvě otázky. První je, zda je lysin v tomto případě dobrým mimetikem argininu. Na ni se váže druhá otázka a to, jakou roli mají argininy v doméně C faktoru IGF-II. K zodpovězení těchto otázek a současně hlubšímu porozumění úlohy domény C v IGF-II je třeba provést další výzkum a dále se touto oblastí zabývat.

Dalším předmětem práce byla rekombinantní příprava Gly¹IGF-II v bakteriálním systému *E. coli*. Vzhledem k náročnosti přípravy takto dlouhých analogů (67 aminokyselin) totální chemickou syntézou bylo hlavním cílem zajistit domácí zdroj nativního IGF-II jako referenční molekuly a současně otevřít cestu pro přípravu analogů

IGF-II. Díky relativně přímočarým posttranslačním modifikacím (oxidace SH-skupin na disulfidické můstky) byl zvolen bakteriální systém *E. coli* a exprese proteinu do inkluzí, které představují jistou ochranu proteinu před bakteriálními proteasami. Při expresi proteinu do inkluzí je na druhou stranu nutné protein podrobit renaturačnímu procesu, během kterého jsou nově vytvořeny disulfidické můstky a získána terciární struktura.

Vzhledem k evoluční konzervovanosti disulfidických můstků v rámci celé rodiny insulinu podobných peptidů bylo předpokládáno, že IGF-II bude schopen samovolně přejít do správné konformace. Tento předpoklad se potvrdil a skutečně většina rekombinantně připraveného Gly⁻¹IGF-II zaujala správnou konformaci. K renaturaci proteinu došlo po izolaci His₆GB1-Gly⁻¹IGF-II z inkluzních tělísek a při následné afinitní chromatografii, protože připojený fúzní protein díky své solubilitě a snadnému dosažení nativní konformace usnadňuje přechod připojeného proteinu do nativní konformace [130,131]. Správné uspořádání disulfidických můstků bylo podpořeno i během následného štěpení fúzního proteinu (His₆GB1), které se provádělo v prostředí redukováného a oxidovaného glutathionu v poměru 10 : 1. Z fúzního proteinu zůstal po odštěpení na N-konci molekuly glycín oproti přirozenému IGF-II, který nenarušuje strukturní ani vazebné vlastnosti molekuly [132,133], což bylo současně potvrzeno biofyzikální charakterizací molekuly, jejíž výsledky jsou publikovány v diplomové práci Rozálie Hexnerové [123].

Retenční čas elučního maxima rekombinantně připraveného Gly⁻¹IGF-II se při analýze na RP-HPLC překrýval s komerčně dostupným IGF-II. Vazebné afinity k IR-A i IR-B obou látek byly téměř shodné (5,8 vůči 6,7 % na IR-A a 0,69 a 0,95 % na IR-B). Porovnání vazebné afinity vůči IGF-1R u IGF-II a námi připravené molekuly Gly⁻¹IGF-II bylo zásadní pro použití Gly⁻¹IGF-II jako referenční molekuly pro budoucí biologické testy. Afinita obou molekul byla zcela porovnatelná (4,71 % u IGF-II a 7,06 % u Gly⁻¹IGF-II), což je hlavní ukazatel zastupitelnosti obou molekul. Porovnatelné afinity vůči všem receptorům jsou také důkazem správné konformace Gly⁻¹IGF-II, jelikož nesprávně „sbalený“ protein nevykazuje téměř žádnou afinitu vůči IR ani IGF-1R [134].

7. SOUHRN

Insulin a růstové faktory podobné insulinu vytvářejí spolu s příslušnými receptory (IR a IGF-1R) složitý systém, jehož rovnováha je nezbytná k udržení správných funkcí organismu. V předkládané studii jsme se zabývali úlohou domény C odvozené z IGF-II v ovlivnění afinit k oběma isoformám insulinového receptoru (IR-A a IR-B) a k IGF-1R.

Metodou enzymové semisyntézy byly připraveny analogy insulinu, jejichž C-konec řetězce B je prodloužen o aminokyseliny postupně napodobující první 4 aminokyseliny z domény C IGF-II (S-R-V-S). Jednalo se o analogy S^{B31} -, SR^{B31-32} -, SKV^{B31-33} - a $SKVS^{B31-34}$ -insulin. Účinnost semisyntézy se pohybovala od 0,3 do 5,2 %.

U všech připravených analogů byla potvrzena nižší afinita k IR-A *in vitro* oproti lidskému insulinu (0,09 - 78,3 %). Neočekávaně nízkou afinitu vykazoval SR^{B31-32} -insulin (0,09%). Při stanovení vazebné afinity k IR-B *in vitro* byla u analogů S^{B31} -, SR^{B31-32} - a SKV^{B31-33} -insulinu rovněž prokázána nižší afinita ve srovnání s lidským insulinem (0,19 - 79,8 %), kdy stejně jako v předchozím případě u SR^{B31-32} -insulinu došlo k jejímu výraznému snížení (0,19 %). Pouze analog SKV^{B31-33} -insulin vykazoval vyšší afinitu k IR-A než k IR-B (79,8 versus 55 %). U analogů S^{B31} - a $SKVS^{B31-34}$ -insulinu došlo navzdory předpokladu ke zvýšení afinity k IR-B oproti jejich afinitě k IR-A, přičemž $SKVS^{B31-34}$ -insulin měl dokonce vyšší afinitu k IR-B než lidský insulin (148 %). Dále byly testovány vazebné afinity k IGF-1R *in vitro*. Analogy vykazovaly řádově podobné afinity jako lidský insulin, ale přesto byl patrný malý vzestup afinit k IGF-1R s prodlužujícím se připojeným peptidem (104 – 150 % hodnoty lidského insulinu). Největší afinitu vykazoval SKV^{B31-33} -insulin (150 %, hodnoty lidského insulinu). Afinita analogu SR^{B31-32} -insulinu nebyla stanovena s ohledem na malé množství připraveného materiálu.

Dále byl, v bakteriálním systému *E. coli*, připraven analog lidského IGF-II, Gly¹IGF-II. Molekula má sloužit jako referenční látka a byla charakterizována v porovnání s komerčně dostupným IGF-II (Sigma-Aldrich, USA). U připraveného Gly¹IGF-II byla hmotnostní spektrometrií potvrzena očekávaná molekulární hmotnost (7521,54) a pomocí analytické RP-HPLC stanoven shodný retenční čas vrcholu elučního maxima s komerčně dostupným IGF-II. U obou látek byly stanoveny porovnatelné hodnoty afinit k jednotlivým typům receptorů *in vitro*.

Předkládaná diplomová práce přinesla další poznatky o úloze domény C faktoru IGF-II a věřím, že získaná data budou podkladem pro další výzkum této oblasti. Zároveň

byla navržena nová metoda přípravy analogů IGF-II, která otevírá cestu ke snadnější přípravě dalších analogů IGF-II.

REFERENCE

1. **Luft, R.**, *Diabetologia* **32**:399-401 (1989).
2. **Cooper, T., Ainsberg, A.**: BREAKTHROUGH:Elizabeth Huges, the discovery of insulin and the making of a medical miracle, Nakladatelství St. Martin's Press, New York (2010)
3. Nobelprize.org:
<http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1923/banting-bio.html>; staženo dne 24.3.2014.
4. **Ryle, A., Sanger, F., Smith, L., Kitai, R.**, *Biochemical Journal* **60**:541-56 (1955).
5. **de B MacNider, W.**, 1946. BIOGRAPHICAL MEMOIRS. Bibliographical memoir of John Jacob Abel 1857-1938: National Academy of Sciences of the United States of America. p 229-57.
6. **Schlichtkrull, J.**, *Acta Paediatrica Scandinavica* :37-40 (1977).
7. **Adams, M., Blundell, T., Dodson, E., Dodson, G., Vijayan, M. a kol.** *Nature* **224**:491-& (1969).
8. Nobelprize.org:
<http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1964/hodgkin-facts.html>; staženo dne 24.3.2014.
9. **Steiner, D., Oyer, P.**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **57**:473-& (1967).
10. **Steiner, D., Cunningham, D., Spiegelma, L., Aten, B.**, *Science* **157**:697-& (1967).
11. **Smeekeens, S., Steiner, D.**, *Journal of Biological Chemistry* **265**:2997-3000 (1990).
12. **Shabanpoor F, Separovic F, Wade J, Litwack G.** *Vitamins and Hormones Insulin and Igfs* **80**:1-31(2009).
13. **De Meyts P.**, *Bioessays* **26**:1351-62 (2004).
14. **Kemmler, W., Steiner, D., Borg, J.**, *Journal of Biological Chemistry* **248**:4544-51 (1973).
15. **Docherty, K., Carroll, R.J., Steiner, D.F.**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **79**:4613-7 (1982).
16. **Baker, E., Blundell, T., Cutfield, J., Cutfield, S., Dodson, E. a kol.**, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **319**:369-& (1988).
17. **Conlon, J.**, *Peptides* **22**:1183-93 (2001).
18. **Zhong, J.**: <http://www.intechopen.com/books/type-1-diabetes/endoplasmic-reticulum-er-stress-in-the-pathogenesis-of-type-1-diabetes>; staženo dne 12. 2. 2014
19. **Lemmon, M., Schlessinger, J.**, *Cell* **141**:1117-34 (2010).
20. **Bass, J., Chiu, G., Argon, Y., Steiner, D.**, *Journal of Cell Biology* **141**:637-46 (1998).
21. **De Meyts, P., Whittaker, J.**, *Nature Reviews Drug Discovery* **1**:769-83 (2002).
22. **Seino, S., Bell, G.**, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **159**:312-6 (1989).
23. **Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., Vigneri, R.**, *Endocrine Reviews* **30**:586-623 (2009).
24. **Vogt, B., Carrascosa, J., Ermel, B., Ullrich, A., Haring, H.**, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **177**:1013-8 (1991).
25. **Kosaki, A., Pillay, T., Xu, L., Webster, N.**, *Journal of Biological Chemistry* **270**:20816-23 (1995).

26. **Frasca, F., Pandini, C., Scalia, P., Sciacca, L., Mineo, R. a kol.,** *Molecular and Cellular Biology* **19**:3278-88 (1999).
27. **Menting, J., Whittaker, J., Margetts, M., Whittaker, L., Kong, G. a kol.,** *Nature* **493**:241-U76 (2013).
28. **Chan S, Steiner D.** *American Zoologist* **40**:213-22 (2000).
29. **Blundell, T., Cutfield, J., Cutfield, S., Dodson, E., Dodson, G. a kol.,** *Acta Crystallographica Section a* **28**:S34-S(1972).
30. **Freychet, P., Roth, J., Neville, D.,** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**:1833-& (1971).
31. **Gliemann, J., Gammeltoft, S.,** *Diabetologia* **10**: 105-13 (1974).
32. **Brandenburg, D.,** Insulin at the German Wool Research InstituteRetrospect and outlook, v knize Insulin and related proteins–Structure to Function and Pharmacology (Federwish, M., Dieken, L., De Meyts, P., eds.): Kluwer Academic Publishers, London (str.7-28) (2002).
33. **Pullen, R., Lindsay, D., Wood, S., Tickle, I., Blundell, T. a kol.,** *Nature* **259**:369-73 (1976).
34. **Schaffer, L.,** *European Journal of Biochemistry* **221**:1127-32 (1994).
35. **De Meyts, P., Wallach, B., Christoffersen, C., Urso, B., Gronskov, K. a kol.,** *Hormone Research* **42**:152-69 (1994).
36. **Kiselyov, V.V., Versteyhe, S., Gauguin, L. a De Meyts, P.,** *Mol.Syst.Biol.***5**, 243 (2009).
37. **Whittaker, L., Hao, C., Fu, W., Whittaker, J.,** *Biochemistry* **47**:12900-9 (2008).
38. **White, M., Shoelson, S., Keutmann, H., Kahn, C.,** *Journal of Biological Chemistry* **263**:2969-80 (1988).
39. **Rosen, O.M., Herrera, R., Olowe, Y., Petruzzelli, L.M., Cobb, M.H.,** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **80**:3237-40 (1983).
40. **White, M.,** *Molecular and Cellular Biochemistry* **182**:3-11 (1998).
41. **Dearth, R., Cui, X., Kim, H., Hadsell, D., Lee, A.,** *Cell Cycle* **6**:705-13 (2007).
42. **Bjornholm, M., He, A., Attersand, A., Lake, S., Liu, S. a kol.,** *Diabetologia* **45**:1697-702 (2002).
43. **Taniguchi, C., Emanuelli, B., Kahn, C.,** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**:85-96 (2006).
44. **Cai, D., Dhe-Paganon, S., Melendez, P., Lee, J., Shoelson, S.,** *Journal of Biological Chemistry* **278**:25323-30 (2003).
45. **Gustafson, T., He, W., Craparo, A., Schaub, C., ONeill, T.,** *Molecular and Cellular Biology* **15**:2500-8 (1995).
46. **Cheng, Z., Tseng, Y., White, M.,** *Trends in Endocrinology and Metabolism* **21**:589-98 (2010).
47. **Shepherd, P., Withers, D., Siddle, K.,** *Biochemical Journal* **333**:471-90 (1998).
48. **Backer, J., Myers, M., Shoelson, S., Chin, D., Sun, X. a kol.,** *Embo Journal* **11**:3469-79 (1992).
49. **Rordorfnikolic, T., Vanhorn, D.J., Chen, D.X., White, M.F., Backer, J.M.,** *Journal of Biological Chemistry* **270**:3662-6 (1995).
50. **Liu, B., Jablonowski, K., Shah, E., Engelmann, B., Jones, R. a kol.,** *Molecular & Cellular Proteomics* **9**:2391-404 (2010).
51. **Mora, A., Komander, D., van Aalten, D., Alessi, D.,** *Seminars in Cell & Developmental Biology* **15**:161-70 (2004).

52. **Sano, H., Kane, S., Sano, E., Miinea, C., Asara, J. a kol.,** *Journal of Biological Chemistry* **278**:14599-602 (2003).
53. **Frame, S., Cohen, P.,** *Biochemical Journal* **359**:1-16 (2001).
54. **Welsh, G., Miller, C., Loughlin, A., Price, N., Proud, C.,** *Febs Letters* **421**:125-30 (1998).
55. **Proud, C.,** *Biochemical Society Transactions* **34**:213-6 (2006).
56. **Foretz, M., Guichard, C., Ferre, P., Foufelle, F.,** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:12737-42 (1999).
57. **Caruso, M., Maitan, M., Bifulco, G., Miele, C., Vigliotta, G. a kol.,** *Journal of Biological Chemistry* **276**:45088-97 (2001).
58. **Kwon, H., Huang, B., Unterman, T., Harris, R.,** *Diabetes* **53**:899-910 (2004).
59. **Witters, L., Watts, T., Daniels, D., Evans, J.,** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**:5473-7 (1988).
60. **Kim, D.W.:** <http://visnu528.blogspot.cz/2013/04/pkbakt-signaling-cell-2007.html>, staženo dne 27.4.2014.
61. **Pruett, W., Yuan, Y., Rose, E., Batzer, A., Harada, N. a kol.,** *Molecular and Cellular Biology* **15**:1778-85 (1995).
62. **Feng, G.,** *Experimental Cell Research* **253**:47-54 (1999).
63. **Neel, B., Gu, H., Pao, L.,** *Trends in Biochemical Sciences* **28**:284-93 (2003).
64. **Goalstone, M., Draznin, B.,** *Journal of Biological Chemistry* **271**:27585-9 (1996).
65. **Goalstone, M., Leitner, J., Wall, K., Dolgonos, L., Rother, K. a kol.,** *Journal of Biological Chemistry* **273**:23892-6 (1998).
66. **Gureasko, J., Galush, W., Boykevich, S., Sondermann, H., Bar-Sagi, D. a kol.,** *Nature Structural & Molecular Biology* **15**:452-61 (2008).
67. **Ramos, J.,** *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**:2707-19 (2008).
68. **Yoon, S., Seger, R.,** *Growth Factors* **24**:21-44 (2006).
69. **Ceresa, B., Pessin, J.,** *Molecular and Cellular Biochemistry* **182**:23-9 (1998).
70. **Roux, P., Blenis, J.,** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**:320-+ (2004).
71. **Lawlor, M., Alessi, D.,** *Journal of Cell Science* **114**:2903-10 (2001).
72. **Downward, J.,** *Nature Cell Biology* **1**:E33-E5 (1999).
73. **Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M., Lin, M., Juo, P. a kol.,** *Cell* **96**:857-68 (1999).
74. **ODell, W.,:** http://www.biocarta.com/pathfiles/h_insulinpathway.asp , staženo dne 15.4.2014
75. **Goalstone, M.L. (2004) :** <http://www.msdlatinamerica.com/diabetes/sid604903.html>, staženo dne 15.4. 2014.
76. **Gual, P., Gonzalez, T., Gremaux, T., Barres, R., Le Marchand-Brustel, Y. a kol.,** *Journal of Biological Chemistry* **278**:26550-7 (2003).
77. **Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J.,** *Biochimie* **87**:99-109 (2005).
78. **Pessin, J., Saltiel, A.,** *Journal of Clinical Investigation* **106**:165-9 (2000).
79. **Cusi, K., Maezono, K., Osman, A., Pendergrass, M., Patti, M. a kol.,** *Journal of Clinical Investigation* **105**:311-20 (2000).
80. **Randle, P.,** *Diabetes-Metabolism Reviews* **14**:263-83 (1998).
81. **Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M., Dufour, S. a kol.,** *Journal of Clinical Investigation* **103**:253-9 (1999).
82. **Fair, A., Dai, Q., Shu, X., Matthews, C., Yu, H., a kol.,** *Cancer Detection and Prevention* **31**:214-9 (2007).

83. **Humbel, R.**, *European Journal of Biochemistry* **190**:445-62 (1990).
84. **Pollak, M., Schernhammer, E., Hankinson, S.**, *Nature Reviews Cancer* **4**:505-18 (2004).
85. **LeRoith, D., Roberts, C.**, *Cancer Letters* **195**:127-37 (2003).
86. **Daughaday, W., Rotwein, P.**, *Endocrine Reviews* **10**:68-91 (1989).
87. **Renahan, A., Jones, J., O'Dwyer, S., Shalet, S.**, *Growth Hormone & Igf Research* **13**:341-6 (2003).
88. **Frystyk, J.**, *Growth Hormone & Igf Research* **14**:337-75 (2004).
89. **Firth, S., Baxter, R.**, *Endocrine Reviews* **23**:824-54 (2002).
90. **Denley, A., Cosgrove, L., Booker, G., Wallace, J., Forbes, B.**, *Cytokine & Growth Factor Reviews* **16**:421-39 (2005).
91. **Desouza, A., Hankins, G., Washington, M., Orton, T., Jirtle, R.**, *Nature Genetics* **11**:447-9 (1995).
92. **Jamieson, T., Brizel, D., Killian, J., Oka, Y., Jang, H. a kol.**, *Bmc Cancer* **3** (2003).
93. **Siddle, K.**, *Journal of Molecular Endocrinology* **47**:R1-R10 (2011).
94. **Zapf, A., Hsu, D., Olefsky, J.**, *Endocrinology* **134**:2445-52 (1994).
95. **Mastick, C., Brady, M., Printen, J., Ribon, V., Saltiel, A.**, *Molecular and Cellular Biochemistry* **182**:65-71 (1998).
96. **Benecke, H., Flier, J., Moller, D.**, *Journal of Clinical Investigation* **89**:2066-70 (1992).
97. **Moller, D., Yokota, A., Caro, J., Flier, J.**, *Molecular Endocrinology* **3**:1263-9 (1989).
98. **Mosthalf, L., Grako, K., Dull, T., Coussens, L., Ullrich, A. a kol.**, *Embo Journal* **9**:2409-13 (1990).
99. **Baillyes, E., Nave, B., Soos, M., Orr, S., Hayward, A. a kol.**, *Biochemical Journal* **327**:209-15 (1997).
100. **Soos, M., Field, C., Siddle, K.**, 1993. *Biochemical Journal* **290**:419-26 (1993).
101. **Modan-Moses, D., Janicot, M., McLenithan, J., Lane, M., Casella, S.**, *Biochemical Journal* **333**:825-31 (1998).
102. **Zendehdel, K., Nyren, O., Ostenson, C., Adami, H., Ekbom, A. a kol.**, *Journal of the National Cancer Institute* **95**:1797-800 (2003).
103. **Yamaguchi, Y., Flier, J., Benecke, H., Ransil, B., Moller, D.**, *Endocrinology* **132**:1132-8 (1993).
104. **Sciaccia, L., Prisco, M., Wu, A., Belfiore, A., Vigneri, R. a kol.**, *Endocrinology* **144**:2650-8 (2003).
105. **De Meyts, P.**, *Endocrinology* **153**:2054-6 (2012).
106. **Gauguin, L., Klaproth, B., Sajid, W., Andersen, A., McNeil, K. a kol.**, *Journal of Biological Chemistry* **283**:2604-13 (2008).
107. **Palsgaard, J.**, Receptor Biding Properties of Twenty-five Different Histricomorph-like Human Insulin Analogs. Diplomová práce: University of Copenhagen, Denmark (2003), cit. dle: [106].
108. **Alvino, C.L., Ong, S.C., McNeil, K.A., Delaine, C., Booker, G.W. a kol.**, *Plos One* **6** (2011).
109. **Kurtzhals, P., Schaffer, L., Sorensen, A., Kristensen, C., Jonassen, I. a kol.**, *Diabetes* **49**:999-1005 (2000).
110. **Bayne, M., Applebaum, J., Underwood, D., Chicchi, G., Green, B. a kol.**, *Journal of Biological Chemistry* **264**:11004-8 (1989).

111. **Kristensen, C., Andersen, A., Hach, M., Wiberg, F., Schaffer, L. a kol.,** *Biochemical Journal* **305**:981-6 (1995).
112. **Cara, J., Mirmira, R., Nakagawa, S., Tager, H.,** *Journal of Biological Chemistry* **265**:17820-5 (1990).
113. **Denley, A., Brierley, G.V., Carroll, J.M., Lindenberg, A., Booker, G.W. a kol.,** *Endocrinology* **147**:1029-36 (2006).
114. **Drejer, K.,** *Diabetes-Metabolism Reviews* **8**:259-85 (1992).
115. **Fields, G., Noble, R.,** *International Journal of Peptide and Protein Research* **35**:161-214 (1990).
116. **Kaiser, E., Colescot, R. L., Bossinge, C. D., Cook, P.,** *Analytical Biochemistry* **34**:595-& (1970).
117. **Merrifield, R.,** *Biochemistry* **3**:1385-& (1964).
118. **Povalová, A.:** Syntéza a biochemická charakterizace hybridních analogů lidského insulínu a IGF-2: Bakalářská práce, PřF UK v Praze, katedra biochemie (2013).
119. **Žákova, L., Zyka, D., Ježek, J., Hanclova, I., Šanda, M. a kol.,** *Journal of Peptide Science* **13**:334-41 (2007).
120. **Carpenter, F.,** *Archives of Biochemistry and Biophysics* **78**:539-45 (1958).
121. **Svoboda, I., Brandenburg, D., Barth, T., Gattner, H., Jiráček, J. a kol.,** *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **375**:373-8 (1994).
122. **Nakagawa, S., Tager, H.,** *Biochemistry* **31**:3204-14 (1992).
123. **Hexnerová, R.:** NMR studie metabolicky aktivních peptidů: Diplomová práce, PřF UK v Praze, katedra fyzikální chemie (2014).
124. **Shapiro, A., Vinuela, E., Maizel, J.,** *Biochemical and Biophysical Research Communications* **28**:815-& (1967).
125. **Raymond, S., Weintraub, L.,** *Science* **130**:711 (1959).
126. **Laemmli, U.,** *Nature* **227**:680-& (1970).
127. **Schagger, H.,** *Nature Protocols* **1**:16-22 (2006).
128. **Merril, C., Goldman, D., Sedman, S., Ebert, M.,** *Science* **211**:1437-8 (1981).
129. **Morcavallo, A., Genua, M., Palummo, A., Kletvikova, E., Jiracek, J., a kol.,** *Journal of Biological Chemistry* **287**:11422-36 (2012).
130. **Gronenborn, A., Filpula, D., Essig, N., Achari, A., Whitlow, M., a kol.,** *Science* **253**:657-61 (1991).
131. **Zhou, P., Wagner, G.,** *Journal of Biomolecular Nmr* **46**:23-31 (2010).
132. **Francis, G., Ross, M., Ballard, F., Milners, S., Senn, C. a kol.,** *Journal of Molecular Endocrinology* **8**:213-23 (1992).
133. **Williams, C., Rezgui, D., Prince, S., Zaccheo, O., Foulstone, E. a kol.,** *Structure* **15**:1065-78 (2007).
134. **Sohma, Y., Hua, Q., Liu, M., Phillips, N., Hu, S. a kol.,** *Journal of Biological Chemistry* **285**:5040-55 (2010).